

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln

Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus H o l l d a c k

Die Wirkung von Phythämagglutinin
auf Knochenmarkkulturen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von S a l c h o w, Peter
aus Berlin

1967

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln

Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus H o l l d a c k

Die Wirkung von Phythämagglutinin
auf Knochenmarkkulturen.



Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von S a l c h o w, Peter
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. W i t t

Referent: Priv.Doiz.Dr.med. Irene B o l l

Korreferent: Professor Dr.med. Willy S c h w a r z



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 17. April 1967

Inhaltsverzeichnis.

Seite 1 Einleitung

Seite 8 Methode

Seite 27 Ergebnisse

Seite 53 Diskussion

Seite 64 Zusammenfassung

Die Wirkung von Phythämagglutinin auf Knochenmarkkulturen.

Einleitung: Definition, chemische Natur,

Bedeutung und Geschichte der Phythämagglutinine.

Fragestellung.

Phythämagglutinine sind aus Pflanzen gewonnene Stoffe, die rote Blutkörperchen von Menschen oder Tieren agglutinieren können.

Über die chemische Natur der Phythämagglutinine (PHA) bestehen noch unterschiedliche Meinungen, die wohl nicht zuletzt dadurch zustande kommen, dass verschiedene Untersucher ihr Phythämagglutinin aus verschiedenen Pflanzen und mit unterschiedlichen Methoden gewinnen.

Am besten lassen sich die Verfechter der einzelnen Anschauungen in zwei Gruppen unterteilen:

- 1) diejenigen, die die PHA für Eiweißstoffe halten und
- 2) diejenigen, die das bestreiten.

Neuere Ergebnisse scheinen jedoch für die Eiweißnatur der PHA zu sprechen. "Auf Grund umfangreicher und sorgfältiger Ergebnisse kamen ENSGRABER, KRÜPE und ENSGRABER-HATTINGEN zum Schluß, dass die PHA einer einheitlichen Stoffklasse, nämlich dem Gammaglobulinsystem zuzuordnen sind, welches den entsprechenden animalischen Globulinen durchaus an die Seite zu stellen ist". (1)

Schon 1887/88 entdeckte Herrmann STILLMARK die PHA. Er

bemerkte als erster die Eigenschaft der PHA, rote Blutkörperchen zu agglutinieren.

Im weiteren Verlauf ihrer Geschichte wurden sie wegen ihrer Ähnlichkeit mit bakteriellen Toxinen von verschiedenen Wissenschaftlern als Modellantigene benutzt und dienten unter anderem auch Paul EHRLICH für seine Immunisierungsversuche an Mäusen.

Erst etwa 20 Jahre nach der Entdeckung dieser nicht spezifischen, sogenannten toxischen PHA durch STILLMARK wurden die sogenannten nichttoxischen PHA von LANDSTEINER und RAUBITSCHHECK entdeckt. Auch sie dienten wie die toxischen erst als Antigene für die serologische Forschung.

Erst nach dem II. Weltkrieg gelang es BOYD in Amerika und RENKONEN in Finnland PHA herauszufinden, welche spezifisch nur Blutkörperchen einer bestimmten Blutgruppe zu agglutinieren vermochten. Damit war praktisch der Weg gewiesen für eine Verwendung der PHA zur Blutgruppendiagnostik (1).

OSGOOD (2) war es dann, der Methoden zur Züchtung von Blutkulturen entwickelte, bei denen er PHA dazu benutzte, die Erythrozyten zu agglutinieren. So war er in der Lage, mit verhältnismässig geringem Aufwand reine Leukocytenkulturen anzulegen.

Bei Anwendung dieser Kulturmethode bemerkten jedoch verschiedene Autoren auffällige Veränderungen an den aus dieser Kultur gewonnenen Zellen (2).

Bereits nach einem Tag sind alle Granulozyten verschwunden und viele der kleinen Lymphozyten beginnen ein reichlicheres und mehr basophiles Cytoplasma aufzuweisen (4). Im Plasma werden Vakuolen sichtbar (5). Im Kern tritt ein Nukleolus auf, der die Zellen als Prolymphozyten charakterisiert (6). Im Elektronenmikroskop sieht man eine Zunahme der Ribosomen. Das endoplasmatische Reticulum tritt stärker in Erscheinung und es treten kleine Vesikel auf (7).

Nach zwei bis drei Tagen fallen diese Erscheinungen noch stärker ins Auge, weil erstens der Grad der Veränderungen noch zugenommen hat und weil zweitens die Zahl der an den Veränderungen teilnehmenden Zellen größer geworden ist. Neben normalen kleinen Lymphozyten sieht man große lymphoblastenartige Zellen, deren Kern mehrere Nukleoli enthält und dessen Chromatin aufgelockert erscheint. (4, 5, 6, 7) Elektronenoptisch findet man im Cytoplasma vesikuläre Erweiterungen und zahlreiche freie Ribosomen. In der Nähe des endoplasmatischen Reticulums treten große "dense bodies" auf (7).

Im Verlauf des dritten und vierten Tages treten retikulo-

endotheliale Elemente in Erscheinung (4, 6). ELVES (7) beschreibt nach 72 Stunden im Elektronenmikroskop zahlreiche Mitochondrien, reichlich Ribosomen, eine gut formierte Golgizone, ein Ergastoplasma mit rauhen Membranen und zahlreiche osmiophile Körperchen. Die Zellen erweisen sich damit als Plasmazellen. HIRSCHHORN wies nach, dass die stimulierten Lymphozyten Gamma-Globuline produzieren (9).

Morphologisch läßt sich also unter dem Einfluss von PHA folgende Entwicklungsreihe beobachten: die meisten der kleinen Lymphozyten wandeln sich bis zum zweiten oder dritten Tag nach Ansetzen der Kultur über Prolymphozyten in Lymphoblasten um. Später treten dann vermehrt retikuloendotheliale Elemente auf.

Haben die Lymphozyten dann am zweiten oder dritten Tag das Stadium des "Lymphoblasten" erreicht, so zeigen sie eine starke Mitoseaktivität. Das vermehrte Auftreten von Mitosen der lymphatischen Elemente in Blutkulturen unter dem Einfluß von PHA wurde von vielen Autoren beobachtet und ist unbestrittene Tatsache (3, 4, 5, 6, 8, 10). Ungeklärt und bis jetzt noch Gegenstand von Vermutungen ist die Frage nach dem Wirkungsmechanismus über den das PHA hier angreift.

EPSTEIN (11) hat gefunden, dass die Lymphozyten unter Einwirkung von PHA ihre RNS-Synthese verstärken (9).

Sie wachsen so zu größeren basophilen Zellen heran. Diese Zellen produzieren jetzt vermehrt DNS (4, 12) und schaffen damit die Voraussetzung für eine Zellteilung, die dann auch vollzogen wird.

Warum jedoch die Zelle durch PHA veranlaßt wird, plötzlich verstärkt DNS zu bilden, bleibt weiterhin im Unklaren.

Viele Autoren nehmen an, dass der Auslösemechanismus den Charakter einer Antigen-Antikörper-Reaktion besitzt. Dafür spricht die Ähnlichkeit der durch PHA induzierten Vorgänge mit den Reaktionen von Blutkulturen Mantoux-positiver Individuen auf Tuberkulin (13). Auch hier wurden vermehrt Mitosen gefunden; ebenso bei Blutkulturen, die mit Antiseren von mit menschlichen Leukozyten sensibilisierten Kaninchen behandelt wurden (14). Die Theorie, dass es sich bei der Wirkung der PHA um eine Antigen-Antikörper-Reaktion handelt, wird u.a. gestützt durch die Untersuchungen HIRSCHHORNs und auch der von ELVES, die fanden, dass Lymphozyten Gamma-Globuline bilden (4) und dadurch durchaus an immunologischen Reaktionen teilnehmen können. Ferner wurde gezeigt, dass PHA eine Antikörperbildung auslösen kann (15) und somit als Antigen sicher in Frage kommt.

Außerdem wird in der einschlägigen Literatur häufig diskutiert, dass Granuloblasten-Mitosen bei der Antikörper-

produktion fester Bestandteil sein sollen (16). Dagegen wendet sich jedoch PUNNET (16), der bei vergleichenden Messungen der Antikörpertiter des Kulturfiltrates (in dem ja die Mitosen ablaufen) und des Mediums einschließlich Serum vor der Kultur keine unterschiedlichen Werte fand. Wären die Leukozytenteilungen Bestandteil der Antigen-Antikörper-Produktion, so müßte beim Auftreten von Mitosen ein erhöhter Antikörpertiter in der Kultur zu erwarten sein.

Eine weitere Einschränkung muß gemacht werden, weil PHA auch auf Kulturen von Neugeborenen, also noch nicht sensibilisierten Individuen, wirkt (11). Die besprochenen Reaktionen treten beim PHA auch schneller auf und sind heftiger als bei anderen Antigenen (z.B. Tuberkulin) (9, 11).

NOWELL (3) vermutet, dass PHA nicht direkt die Zellteilung einleitet, sondern dass es die Zelle lediglich in einen teilungsfähigen Zustand überführt, also den Lymphozyten in den Lymphoblasten, der dann ohne weiteren äusseren Anlaß sich zu teilen beginnt.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, wie PHA auf eine Zellkultur wirkt, deren Zellen sich zu einem großen Teil im teilungsfähigen Zustand befinden, z.B. Knochenmarkkulturen.

NOWELL (3) gibt einen kurzen Hinweis, dass er bei Knochenmarkkulturen eine Wirkung von PHA nicht habe feststellen können, ohne jedoch Näheres mitzuteilen. Aus diesem Grunde haben wir es uns mit dieser Arbeit zur Aufgabe gemacht, die Wirkung von PHA auf Knochenmarkzellen in allen Einzelheiten zu untersuchen.

Hierzu legen wir uns folgende Fragen vor:

- 1) Treten unter dem Einfluß des PHA morphologische Veränderungen an irgendeiner Zellart auf?
- 2) Läßt sich eine Wirkung von PHA auf die Mitosehäufigkeit und Mitosephasenverteilung in den Kulturen feststellen?
- 3) Ändert PHA die prozentuale Verteilung der Zellen in den Versuchen gegenüber den Kontrollen?

Methode.

Das von Patienten gewonnene Knochenmark wurde nach der Methode von BOLL und FUCHS (17) kultiviert.

Zu diesem Zweck wurde das durch Sternalpunktion gewonnene Material in ein steriles Uhrglasschälchen mit einigen Tropfen Heparinlösung gespritzt. In ein Blockschälchen mit Heparinlösung (30 E. in 100 ml Hanks Lösung) wurden die Knochenmarkbröckchen aus dem Uhrglasschälchen übernommen. Dieses Material wurde dann wie folgt kultiviert:

Auf einem Objektträger wurde eine Mischung von 4 Teilen Hank, 1 Teil Corhormon und 5 Teilen Plasma desselben Patienten, das etwa eine Stunde vor der Knochenmarkpunktion gewonnen worden war, zur Gerinnung gebracht, darauf ein Markbröckchen gesetzt und mit einem Tropfen Serum desselben Patienten bedeckt. Das Deckglas wurde nun mit Vaseline auf einem Hohlschliffobjektträger befestigt und die ganze Kultur umgedreht, sodaß der koagulierte Tropfen mit dem Knochenmarkbröckchen hing. Mit flüssigem Hartparaffin wurde die Kultur luftdicht abgeschlossen. Sie konnten nun im B-rutschrank bei 37°C bis zur Fixierung bebrütet werden.

Von jedem Punktat wurde sofort ein Ausstrich angefertigt

und nach PAPPENHEIM gefärbt. Drei weitere wurden wie oben beschrieben kultiviert, ein, zwei, bzw. drei Tage bebrütet und dann ausgestrichen; und drei letzte schließlich erhielten einen PHA-Zusatz. Das Kulturmedium hatte dafür folgende Zusammensetzung:

3 Teile Hank, 1 Teil Corhormon, 5 Teile Eigenplasma und 1 Teil PHA (1%ig; BATCH K 4762 von Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England). Diese Versuchskulturen wurden ebenfalls wie die Kontrollkulturen 1,2 bzw. 3 Tage bebrütet und dann gefärbt.

Es wurden insgesamt 70 Ausstriche angefertigt. Von jedem Ausstrich wurden 1000 Zellen gezählt und differenziert. Am Ende des Versuches hatten wir 68 000 Zellen gezählt, weil in zwei Ausstrichen nur 500 Zellen zu zählen waren und ein weiterer Ausstrich nicht differenziert werden konnte.

Ausgezählt wurden vorwiegend die aufgelockerten Randpartien der Präparate, indem wir diese Gebiete mäanderförmig durch unser Gesichtsfeld gleiten ließen. Jedes Gesichtsfeld, daß zu differenzierende Zellen bot, wurde ganz ausgezählt und differenziert.

Es wurden von uns folgende Zellen unterschieden:

Proerythroblasten

basophile Erythroblasten

polychromatische Erythroblasten

oxyphile Erythroblasten

reife Erythroblasten

Myeloblasten

Promyelocyten

Myelocyten

basophile Myelocyten

eosinophile Myelocyten

Jugendliche

Stabkernige

Segmentkernige

basophile Segmentkernige

eosinophile Segmentkernige

Lymphoblasten

Lymphocyten

lymphoide Retikulumzellen

phagocytierende Retikulumzellen

Plasmazellen

Megaka-ryoblasten

Megakaryocyten

Monocyten

Als Unterscheidungsmerkmale galten folgende Kriterien (18):

Proerythroblast: (15 - 22 μ Durchmesser). Der Kern ist
groß und rund. Sein dichtes Chroma-

tinnetz ist feinkörnig strukturiert. Nucleoli sind nicht immer gut sichtbar. Das Protoplasma ist stark basophil und umgibt den Kern meist mit einem gleichmässig schmalen Saum. Oft ist das Plasma in Kernnähe aufgehellt.

Basophiler Erythroblast: (8 - 15 μ Durchmesser).

Gegenüber dem Proerythroblasten ist eine Vergröberung der Chromatinstruktur des Kerns zu beobachten, der bei den reiferen Formen schon eine Radspeichenstruktur erkennen läßt. Das immer noch basophile Protoplasma umgibt den Kern nicht mehr so gleichmässig breit, sondern ist oft zipfelig ausgezogen. Die Kern-Plasma-Relation ist zu Gunsten des Plasmas verschoben.

Polychromatischer Erythroblast: (8 - 12 μ Durchmesser).

Hier hat der Kern meist eine Radspeichenstruktur. Je nach Reifungsgrad, also abhängig vom Hämoglobingehalt, ist die Farbe des Protoplasmas verschieden. Man findet Farben von grau-violett bis grau-rosa.

Oxyphiler Erythroblast: (7 - 10 μ Durchmesser).

Die grobschollige Kernstruktur ist noch zu erkennen. Das Protoplasma ist wegen seines hohen Hämoglobingehaltes nicht von dem der Erythrocyten zu unterscheiden.

Reifer Erythroblast: (7 - 10 μ Durchmesser).

Der oft exzentrische Kern ist pyknotisch und läßt keine Struktur mehr erkennen. Das Protoplasma ist meist oxyphil, kann jedoch auch die graue Farbe des polychromatischen Erythroblasten zeigen. (Sein für die Differenzierung entscheidendes Merkmal ist der pyknotische Kern).

Myeloblast: (um 16 μ Durchmesser).

Der Kern hat in der Regel eine leicht ovale Form. Seine Chromatinstruktur ist sehr feinmaschig und dicht, wodurch ein leicht milchig-trübes Aussehen zu Stande kommt. 2 - 3 Nucleoli sind meist deutlich sichtbar. Das zart

basophile Protoplasma findet sich oft nur an einer Seite des Kerns.

Promyelocyt: (20 - 25 μ Durchmesser).

Der Kern ist von etwas gröberer Struktur als der des Myeloblasten. Auch er zeigt 1 - 2 Nucleoli. Der Protoplasmasaum ist etwas reichlicher und umgibt in der Regel den ganzen Kern. In Kernnähe findet sich eine rötliche Aufhellung, und des öfteren sehen wir schon ein Protoplasma grau-blauer Tönung als Zeichen des Übergangs zum oxyphilen Protoplasma des Myelocyten. Immer weist der Promyelocyt eine oft sehr dichte und grobe azurophile Granulation auf.

Neutrophiler Myelocyt: (14 - 18 μ Durchmesser).

Der meist ovale oder auch nierenförmige Kern hat ein dichtes Chromatinnetz und fast nie Nucleoli. Das Protoplasma ist oxyphil, hat aber oft noch einen grau-blauen Ton. Die feinkörnigen Granula sind neutrophil.

Eosinophiler Myelocyt: (14 - 18 μ Durchmesser).

Er gleicht dem neutrophilen Myelocyt, nur sind hier die Granula grobschollig und eosinophil.

Basophiler Myelocyt: (14 - 18 μ Durchmesser).

Plumpe basophile Granula bedecken Kern und Plasma dieses Myelocyten.

Metamyelocyt: Der Metamyelocyt entspricht in seinem Äusseren bis auf den stärker eingebuchteten und etwas schollig strukturierten Kern dem Myelocyt.

Stabkerniger Granulocyt: Der Kern ist langgezogen und hufeisenförmig gebogen. Oft ist der Kern schon weitgehend pyknotisch. Das Protoplasma entspricht dem des Myelocyten.

Segmentkerniger Granulocyt: (10 - 15 μ Durchmesser).

Der segmentkernige Granulocyt unterscheidet sich vom stabkernigen Granulocyt durch den in meist 4 Segmente unterteilten Kern. Die Segmente sind durch dünne Fäden

miteinander verbunden. Mindestens besteht eine Verdünnung des Kernes auf $\frac{1}{3}$ an einer Stelle.

Eosinophiler segmentkerniger Granulocyt: (10 - 15 μ Durchmesser).

Meist sind nur zwei, selten drei Segmente vorhanden. Eosinophile Granula breiten sich über die ganze Zelle aus.

Basophiler segmentkerniger Granulocyt: (10 - 15 μ Durchmesser).

Die basophilen, groben Granula bedecken meist sehr dicht den zweisegmentierten Kern und das Plasma.

Lymphoblast: (12 - 14 μ Durchmesser).

Der Lymphoblast ähnelt sehr dem Myeloblasten, unterscheidet sich aber von diesem durch eine weniger verwaschene Kernstruktur. In seinem Kern zeigen sich meist eine, bisweilen auch zwei Nucleolen. Sein Plasmasaum ist ziemlich schmal und hellblau, ohne Granula.

Lymphocyt: (9 - 12 μ Durchmesser).

Der dunkle, rotviolette Kern des Lymphocyten ist rund, oval oder auch eingebuchtet. Er ist schollig strukturiert. Das hellblaue Protoplasma umgibt ihn nicht immer vollständig und kann manchmal nur in sehr spärlichen Resten noch vorhanden sein. Es enthält nicht selten wenige feine azurophile Granula.

Lymphoide Retikulumzelle: Die in der Regel runden oder auch ovalen Kerne der lymphoiden Retikulumzellen sind locker strukturiert und weisen meist ein bis zwei Nucleoli auf. Ihr Protoplasma ist von zart hellblauer Farbe und nach aussen oft so undeutlich abgegrenzt, dass die Größe der Zelle nicht zu bestimmen ist. Oft liegen die Kerne nackt da, weil sie beim Ausstreichen vom Plasma getrennt wurden.

Phagocytierende Retikulumzelle: Der Kern ähnelt dem der lymphoiden Retikulumzelle. Das Protoplasma ist hellblau bis grau und kann mannigfaltige Einschlüsse enthalten.

Plasmazellen: (14 - 20 μ Durchmesser).

Die im Verhältnis zum Plasma kleinen runden Kerne liegen exzentrisch. Sie sind von grober, oft radspeichenartiger Struktur. Das reichliche Protoplasma ist stark basophil und stellt sich daher tief dunkelblau dar. Es kann jedoch bisweilen auch heller erscheinen. Fast regelmäßig ist es an einer Seite des Kerns aufgehellt. Häufig sind Vakuolen vorhanden.

Megakaryoblast: (20 μ Durchmesser).

Sein Kern ist groß und rund. Das Chromatin ist unscharf gezeichnet und zeigt deutlich mehrere Nucleolen. Das spärliche Protoplasma ist tief basophil und ohne Granula.

Megakaryocyt: ($\sim$ 100 μ Durchmesser).

Der Kern kann eine vielfältige, meist gelappte Form aufweisen. Das Chromatingerüst ist dicht und ungeordnet. Das amöboid vergrößerte Zellplasma ist violett und zeigt eine feine Granulation. Das Kern-Plasma-Verhältnis ist zu Gunsten des Plasmas verschoben.

Monocyt: (12 - 20 μ Durchmesser).

Sein heller Kern kann sich in verschiedenen Formen darbieten: eingebuchtet, gelappt oder stabförmig. Sein Chromatin zeigt eine zarte, lockere Struktur. Das Protoplasma ist rauchblau gefärbt und fein azurophil granuliert.

(Die Angaben über die Zellgröße wurden entnommen aus MÜLLER - SEIFERT - von KRESS) (19).

Um die Beeinflussung der Mitosehäufigkeit durch PHA festzustellen, wurden alle Zellteilungen, die in den ausgezählten Gesichtsfeldern entdeckt wurden, in ihren verschiedenen Phasen von uns registriert.

Wir unterschieden nach BOLL (20) folgende Mitosephasen:

1. Prophase: Die Kernmembran ist aufgelöst. Die Kernsubstanz ist aufgelockert. Es besteht noch ein festes Spirem, keine Nucleolen.

2. Frühe Metaphase: Die nun gut sichtbaren Chromosomen

sind über die früheren Kerngrenzen hinaus verteilt. Das feste Spirem ist zum lockeren Spirem geworden.

3. Späte Metaphase: Die Chromosomen sind zur Äquatorialplatte bzw. zum Monaster angeordnet.
4. Anaphase: Die zu den Spindelpolen auseinanderweichenden Chromosomen bilden in der meist ovalen Zelle einen Diaster.
5. Telophase: Die nun getrennten Chromosomen bilden ein lockeres Dispirem. Das Protoplasma zeigt eine deutliche Einschnürrung.
6. Rekonstruktionsphase: Das Dispirem hat sich gefestigt. Die fast getrennten beiden Zellen stehen nur noch über ein schmales Plasmafädchen oder garnicht miteinander in Verbindung. Die Zellen haben noch keine Kernmembran und keine Nucleolen ausgebildet.

Als teilungsfähig wurden nach ROHR (21) folgende Zellen angesehen:

Proerythroblast

Basophiler Erythroblast

Polychromatischer Erythroblast

Oxyphiler Erythroblast

Myeloblast

Promyelocyt

Myelocyt

Metamyelocyt

Lymphoblast

lymphoide Reticulumzelle

Plasmazelle

Megakaryoblast

Für unsere Versuchsreihe wurden Kulturen von zehn verschiedenen Patienten angelegt. Es handelt sich bei fast allen Fällen um Patienten mit normalem oder nur leicht verändertem Knochenmark. Im Einzelnen wurden folgende Patienten zur Funktion herangezogen:

1. Patient Otto B., 68 Jahre

Klinische Diagnose: "Kippniere", Herzinsuffizienz,
Lebercirrhose.

Blutbild vom 1.7.64

Ery	: 4,74	Leuko	: 7 800
Hb	: 14,1g%	Stab	: 3
Hb _E	: 30	Segm.	: 59
Ani	: (+)	Lymph.	: 26
Poiki	: ((+))	Mono	: 12
Reti	: 12‰		

Thrombo: 133 000

Diagnose des Knochenmarkpunktates

vom 2.7.1964:

"Es handelt sich um ein normales Knochenmark".

2. Patient: Luise M., 67 Jahre

Klinische Diagnose: Chronische Cholecystitis und
Cholelithiasis, chron. Cystopyelitis
mit fieberhaften Schüben.

Blutbild vom 17.7.64

Ery	: 3,47	Leuko	: 5 950
Hb	: 10,6g%	Bas.	: 1
Hb _E	: 31	Eos.	: 6
Ani	: (+)	Stab.	: 6
Poiki	: ((+))	Segm.	: 53
Poly	: ((+))	Lymph.	: 26
		Mono	: 8

Die Anämie ließ sich durch Fe-Gaben nicht beseitigen.

Weil außerdem eine Anacidität des Magens vorlag,
bestand der Verdacht auf eine perniciöse Anämie.

Das Knochenmarkpunktat vom 25.7.64 ergab jedoch ein
normales Bild.

3. Patient: Kurt H., 63 Jahre

Klinische Diagnose: Polyglobulie

Blutbild vom 24.7.64:

Ery	: 6,14	Leuko	: 10 800
Hb	: 18,8g%	Segm.	: 47
Hb _E	: 31	Lymph.	: 48
Ani	: ((+))	Mono	: 5
Reti	: 24%		

Thrombo: 148 000

Diagnose des Knochenmarkpunktates vom 29.7.64:

Es handelt sich um ein normales Knochenmark.

4. Patient: Felix G., 84 Jahre

Klinische Diagnose: Magencarcinom

Blutbild vom 14.8.64:

Ery	: 4,56	Leuko:	: 18 850
Hb	: 13,0g%	Stab.	: 5
Hb _E	: 29	Segm.	: 33
Ani	: (+)	Lymph.	: 60
Poiki	: +	Mono.	: 2
Reti	: 10‰		
tox. Gran.:	+		

Thrombo: 202 000

Wegen der Lymphocytose wurde am 17.8.64 sternalpunktiert. Die Differenzierung ergab bis auf eine Vermehrung der Lymphocyten ein normales Knochenmark.

5. Patient: Margarete F., 76 Jahre

Klinische Diagnose: Herzinsuffizienz, Kreislauf labilität,
chron. Leberparenchymschaden

Blutbild vom 31.8.64:

Ery	: 3,59	Leuko	: 7 600
Hb	: 14,7g%	Bas.	: 1
Hb _E	: 41	Eos.	: 2
Ani	: ++	Stab.	: 20
Poiki	: (+)	Segm.	: 50
Poly	: +	Lymph.	: 19
		Mono.	: 8
		AMZ.	: 4%

Wegen des Verdachtes auf Perniciöse Anämie oder Osteomyelosklerose wurde am 1.9.64 sternalpunktiert. Es bot sich ein normales Mark lediglich mit einer leichten Linksverschiebung in der Granulopoese.

6. Patient: Adolf M., 73 Jahre

Klinische Diagnose: Plasmocytom

Blutbild vom 6.10.64:

Ery	: 4,60	Leuko	: 5 200
Hb	: 15,1g%	Eos.	: 5
Hb _F	: 33	Stab.	: 4
Ani	: +	Segm.	: 56
Poiki	: (+)	Lymph.	: 30
Poly	: +	Mono.	: 5
tox. Gran.	: (+)	AMZ.	: 5%

Neutrophile z.T. übersegmentiert.

Knochenmarkpunktat vom 14.10.64:

Es bietet sich das Bild eines Plasmocytoms.

7. Patient: Maria H., 81 Jahre

Klinische Diagnose: Ikterus bei wahrscheinlich
maligner Stenose

Blutbild vom 21.10.64:

Ery	: 3,85	Leuko	: 1 850
Hb	: 12,9g%	Stab.	: 16
Hb _F	: 34	Segm.	: 41
Ani	: (+)	Lymph.	: 38
Poiki	: (+)	Mono	: 5
		AMZ.	: 4%

Die Leukopenie ließ eine Systemerkrankung vermuten.

Das Sternalpunktat vom 25.10.64 bot dafür jedoch
keinen Anhalt.

8. Patient: Margarete V., 72 Jahre

Klinische Diagnose: cerebralsklerotische Gefäßveränderungen,

leichter Diabetes mellitus

Blutbild vom 4.11.64:

Ery	: 5,8	Leuko	: 10 900
Hb	: 18,3g%	Bas.	: 1
Hb _E	: 32	Eos.	: 1
Ani	: (+)	Stab.	: 3
Poly	: ((+))	Segm.	: 75
		Lymph.	: 14
		Mono.	: 6

Wegen des Verdachtes auf Polycythaemia vera wurde am 7.11.64 sternalpunktiert.

Das angeregte Knochenmark ohne Zellatypien bot keinen Anhalt für eine Polycythaemia vera.

9. Patient: Helene I., 70 Jahre

Klinische Diagnose: mässiger Leberparenchymschaden, Gerinnungsstörung,

Diabetes mell.,

degenerativer Herzmuskelschaden.

Blutbild vom 13.11.64:

Ery	: 4,62	Leuko	: 5 350
Hb	: 17,9g%	Stab	: 13
Hb _E	: 39	Segm.	: 77
Ani	: ++	Lymph.	: 8
Poiki	: +	Mono.	: 2
Poly	: ++		
Reti	: 14%		

Wegen eines Milztumors wurde am 24.11.64 sternalpunktiert.

Es bot sich ein normales Bild.

10. Patient: Bruno K., 59 Jahre

Klinische Diagnose: Herzinfarkt,

Polyglobulie

Blutbild vom 2.12.64:

Ery	: 5,62	Leuko	: 9 100
Hb	: 20g%	Bas.	: 1
Hb _F	: 36	Eos.	: 4
Ani	: ((+))	Stab.	: 11
Hämatokrit:	54%	Segm.	: 58
		Lymph.	: 18
		Mono.	: 8
		tox. Gran.:	((+))
		AMZ.	: 1%

Thrombo: 661 000

Wegen des Verdachtes auf Polycythaemia vera wurde am 15.12.64 sternalpunktiert.

Der Verdacht konnte nicht bestätigt werden.

Ergebnisse.

- I. Bei der Differenzierung unserer Kulturen fielen uns folgende morphologische Zellveränderungen gegenüber den Originalausstrichen auf:

In der Erythropoese traten bisweilen Formen mit einem pyknotischen, gänseblümchenartig verformten Kern auf. Ihr Plasma war polychromatisch bis oxyphil. In der Größe entsprachen sie den polychromatischen bis reifen Erythroblasten.

Bei den Lymphocyten sahen wir in den Kulturen bisweilen Formen, wie sie auch FISCHER und GROPP in ihren Blutkulturen beobachteten (5): Das Cytoplasma war reichlicher als bei den unveränderten Lymphocyten und war nicht selten in Kernnähe aufgehellt. Der Kern war aufgelockert und zeigte oft eine oder mehrere tiefe Einkerbungen.

Umwandlungen von Lymphocyten in Lymphoblasten unter Einwirkung von PHA zeigten sich nach unseren Untersuchungen nicht.

Die geschilderten Veränderungen in der roten Reihe und bei den Lymphocyten traten sowohl in den Kontrollen wie in den mit PHA behandelten Kulturen auf.

II. Um die Frage nach der Wirkung des PHA auf die Verteilungszahlen der einzelnen Zellarten zu beantworten, wurden für jede Zellart vier Kurven angelegt.

Kurve I : Abszisse : Kultivierungszeit in Tagen.
Ordinate : Differentialzellzahlen der 10
Kontrollkulturen

Kurve II : Abszisse : Kultivierungszeit in Tagen.
Ordinate : Differentialzellzahlen der 10
PHA-Kulturen.

Kurve III : Abszisse : Kultivierungszeit in Tagen.
Ordinate : Mittelwerte der Zellzahlen
aus allen Kontrollkulturen
(ausgezogene Linie) und allen
PHA-Kulturen (gestrichelte
Linie). Die durchschnittliche
Zellzahl in den Originalaus-
strichen ist gleich 100%
gesetzt, und die durchschnitt-
lichen Zellzahlen der Kulturen
darauf umgerechnet in % ausge-
drückt.

Kurve IV: Abszisse : Kultivierungszeit in Tagen.

Ordinate : Abweichungen der Zellzahlen
(absolute Werte) in den einzelnen
PHA-Kulturen (ausgezogene Linien)
von denen in den Kontrollen
(O-Linie) und durchschnittliche
Abweichung der Zellzahl aller
PHA-Kulturen (gestrichelte Linie)
von den Kontrollen.

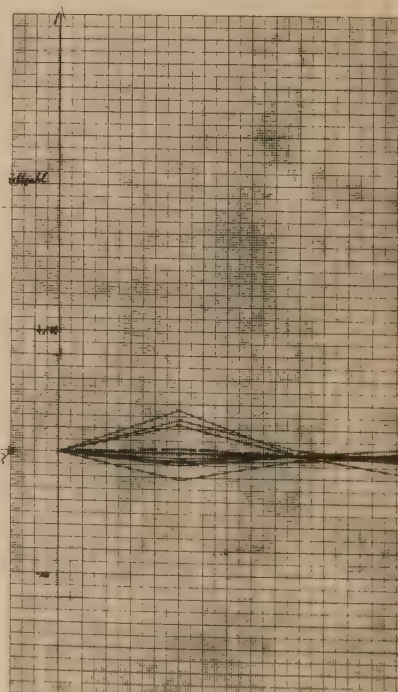
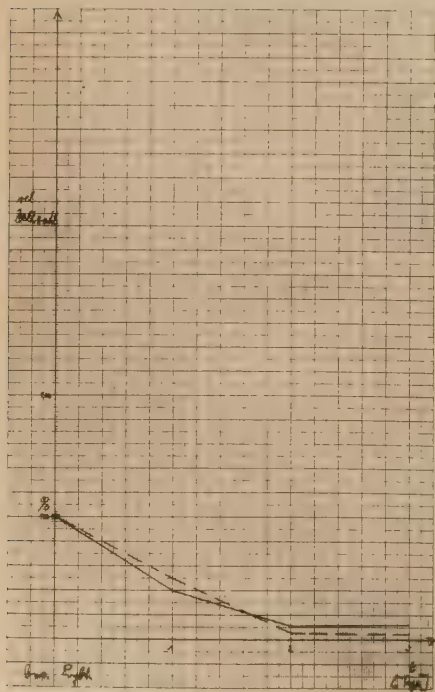
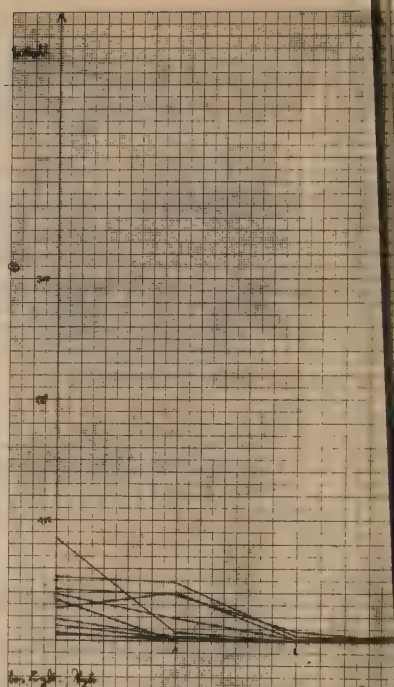
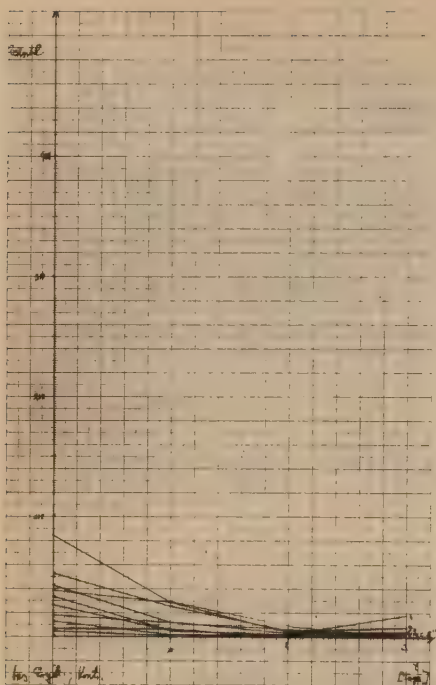
Nicht dargestellt wurden die Verhältnisse bei den Proerythroblasten, oxyphilen Erythroblasten, eosinophilen Myelocyten, basophilen Myelocyten, basophilen segmentkernigen Granulocyten, Lymphoblasten, Monocyten, Megakaryoblasten und Megakaryocyten, weil diese Zellarten in zu geringer Zahl in Erscheinung traten. Es wurden bei 68 000 gezählten Zellen nur 5 Lymphoblasten gefunden.

Basophile Erythroblasten.

I. und II. Die zuerst unterschiedlichen Zellzahlen nehmen im Verlaufe der Kultivierungszeit ab und gleichen sich einander an. Die Kurven bei den Kontrollen verlaufen etwa auf gleichem Niveau wie die Kurven der PHA-Kulturen.

III. Die absinkenden Kurven laufen dicht nebeneinander her.

IV. Die Abweichungen der Zellzahlen nach beiden Seiten halten sich etwa die Waage, so dass die Durchschnittskurven nur wenig von der Nulllinie abweichen.

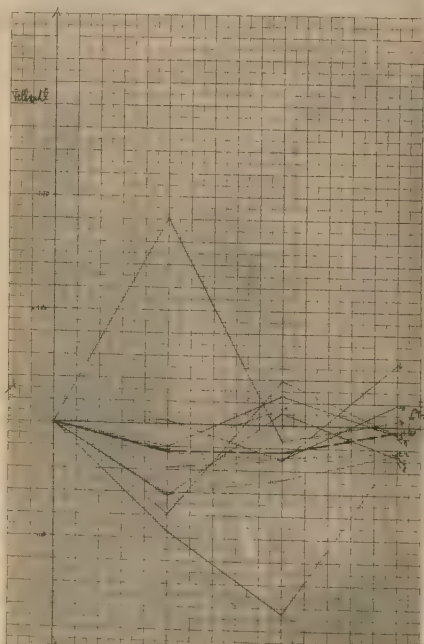
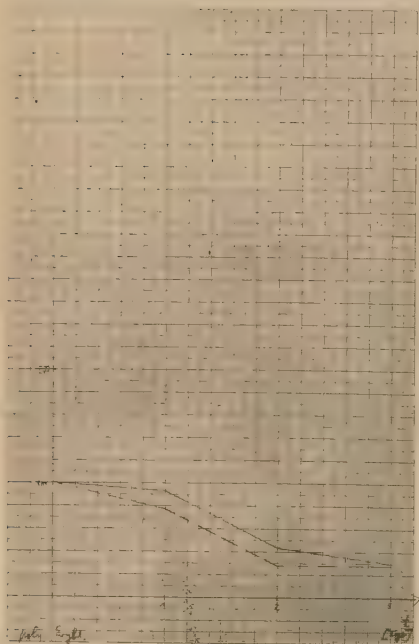
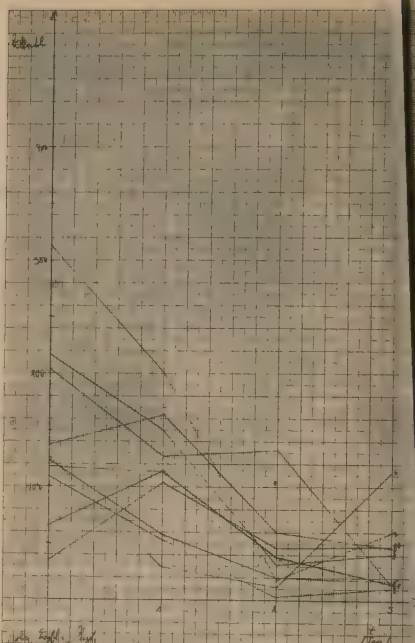


Polychromatische Erythroblasten.

I. und II. Die sehr starken Schwankungen in der Zellzahl zu Beginn werden im Laufe der Zeit mehr und mehr ausgeglichen. Die Kurvenschar in den Versuchen und den Kontrollen verläuft in gleicher Höhe.

III. Die beiden Durchschnittskurven laufen dicht beieinander.

IV. Die durchschnittliche Abweichung der Zellzahl der Versuche von den Kontrollen ist gemessen an der großen Anzahl Zellen nicht hoch. Es kommen aber mitunter ziemlich starke Abweichungen nach oben und unten vor.

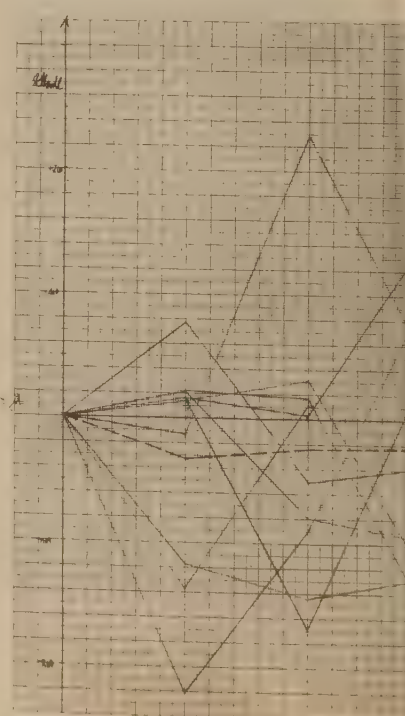
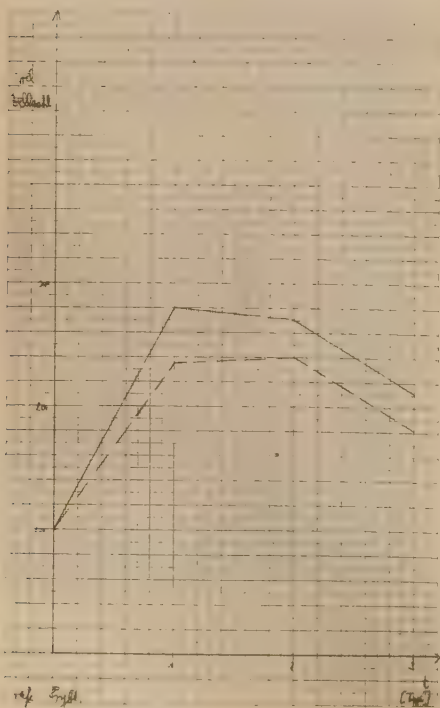
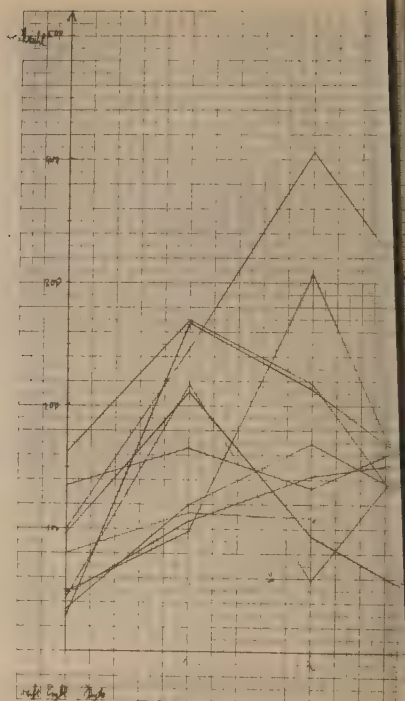
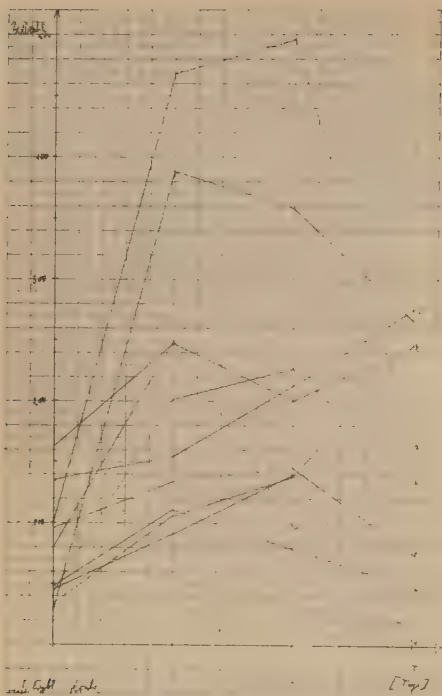


Reife Erythroblasten.

I. und II. Die Differenzen zwischen den Anfangszahlen werden später noch gesteigert. Besonders bei den Kontrollen kommen extrem hohe Werte vor. Die Kurvenschar der Kontrollen liegt etwa auf gleicher Höhe wie die der Versuche.

III. Die Durchschnittskurven der Relativwerte liegen nicht weit voneinander entfernt. Ihr Abstand wird sicher nicht unerheblich von den extremen Schwankungen der Kontrollen nach oben erzeugt.

IV. Die starken Unterschiede der absoluten Zellzahlen der Kontrollen zu denen der Versuche ist hier deutlich sichtbar. Sie weichen jedoch nach oben und nach unten ab, sodass die Durchschnittskurve sich nicht sehr erheblich unter die Nulllinie senkt.

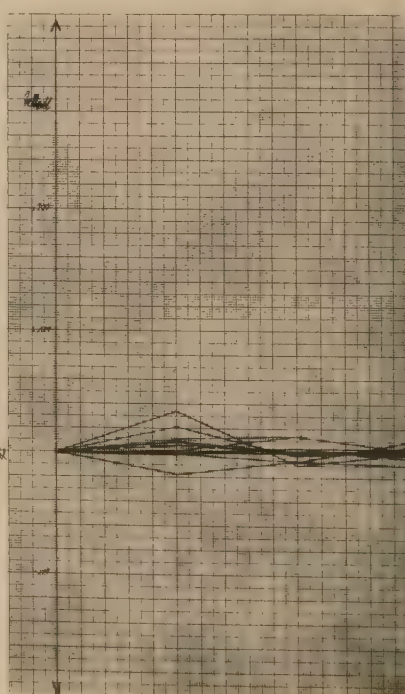
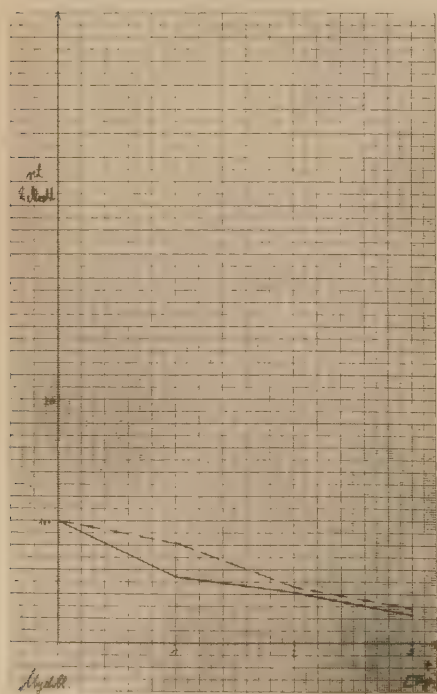
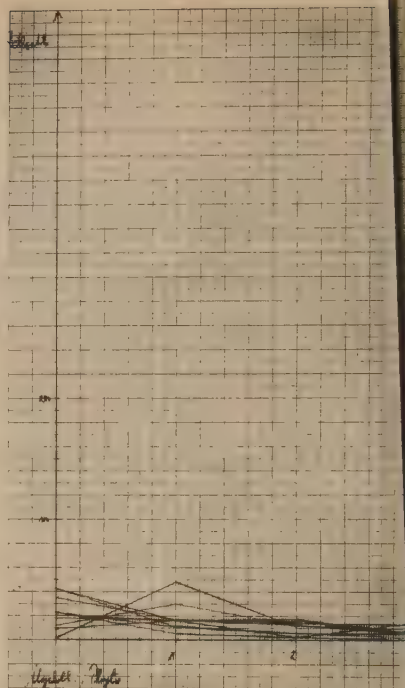
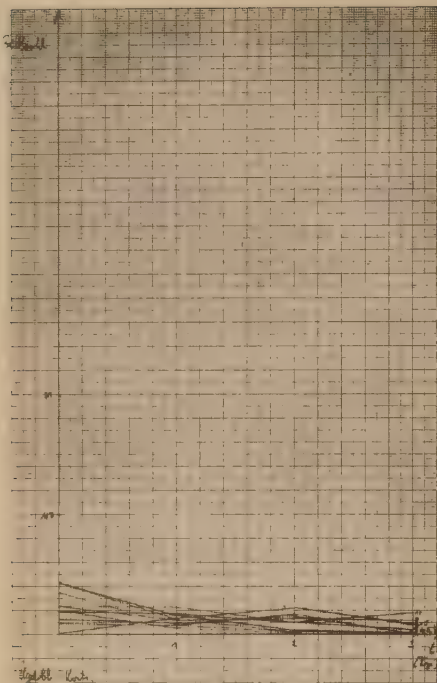


Myeloblasten.

I. und II. Die niedrig verlaufenden Kurven liegen dicht zusammen. Die Kurven der Versuche unterscheiden sich in ihrer Höhe kaum von denen der Kontrollen; lediglich zwei Kurven steigen nach einem Tag etwas über das Niveau der anderen an.

III. Die abfallenden Durchschnittskurven sind nur nach einem Tag etwas weiter von einander entfernt. Hier liegt die Kurve der Zusatzkulturen höher als die der Kontrollen.

IV. Die Abweichungen nach oben und unten gleichen sich fast aus. Die Durchschnittskurve weicht kaum von der Nulllinie ab.

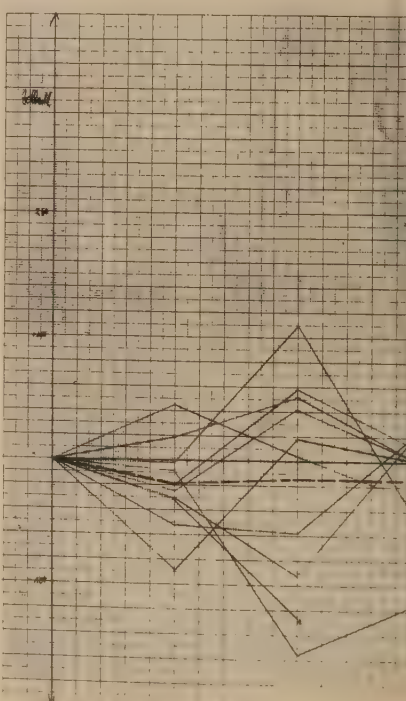
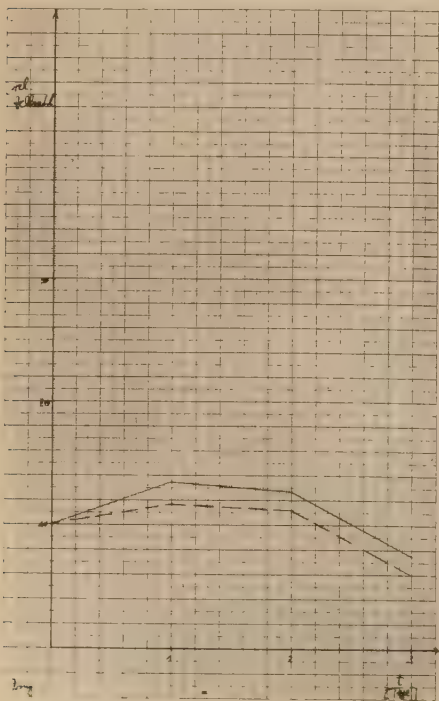
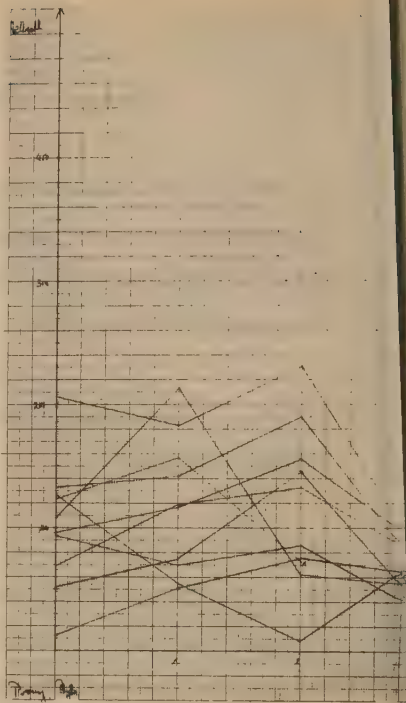
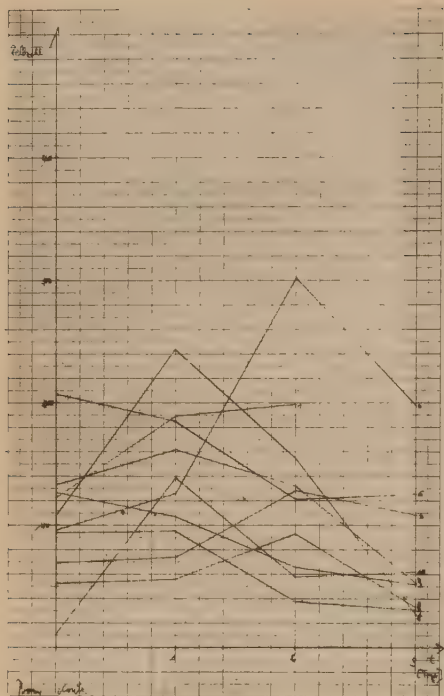


Promyelocyten.

I. und II. Die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Präparaten ist sehr unterschiedlich. Die Kurven liegen beim Vergleichen der Kontrollen mit den Versuchen ungefähr auf gleicher Höhe.

III. Die Durchschnittskurven laufen in nur geringem Abstand voneinander.

IV. Die Abweichungen der Zellzahlen in den Versuchen von denen der Kontrollen ist nicht unerheblich. Die Abweichungen nach beiden Richtungen kompensieren sich jedoch, sodass die Durchschnittskurve sich nur unwesentlich unter die Nulllinie senkt.

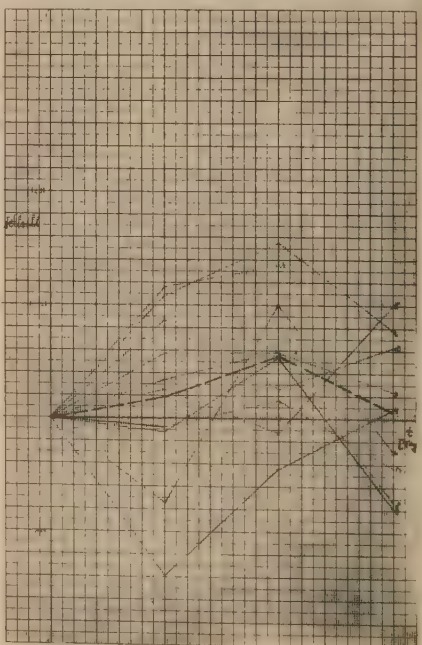
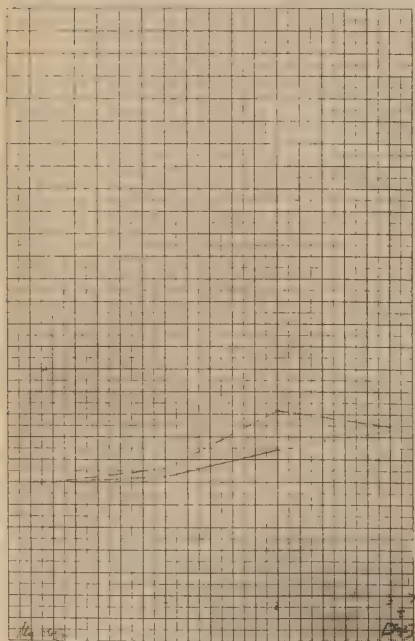
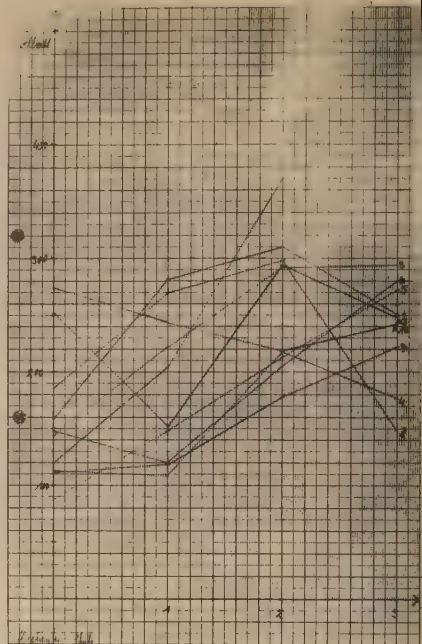
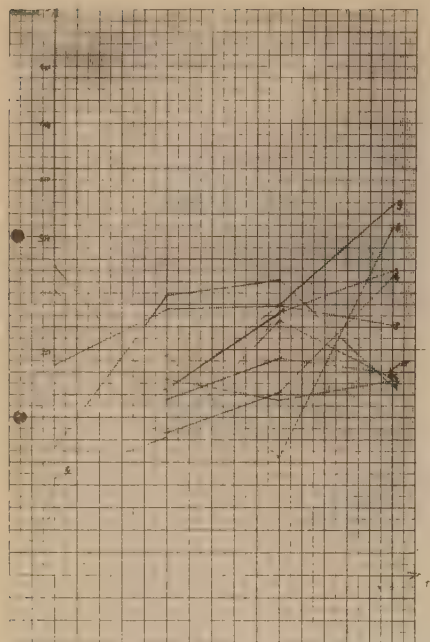


Myelocyten.

I. und II. Wir finden unterschiedliche Zellzahlen in den einzelnen Ausstrichen bei den Kontrollen sowie bei den Zusatzkulturen. Die Kurvenschar bewegt sich bei Kontrollen und Versuchen auf ungefähr gleichem Niveau.

III. Die Durchschnittskurven entfernen sich nicht weit voneinander. Lediglich am zweiten Tag der Kultur liegt die Kurve der PHA-Kulturen über den Kontrollen.

IV. Die Abweichungen der Zellzahlen der beiden Reihen voneinander sind groß, werden jedoch fast ausgeglichen dadurch, dass sie nach beiden Richtungen auseinanderweichen. Lediglich nach zwei Tagen liegt die Durchschnittskurve deutlich über der Nulllinie.

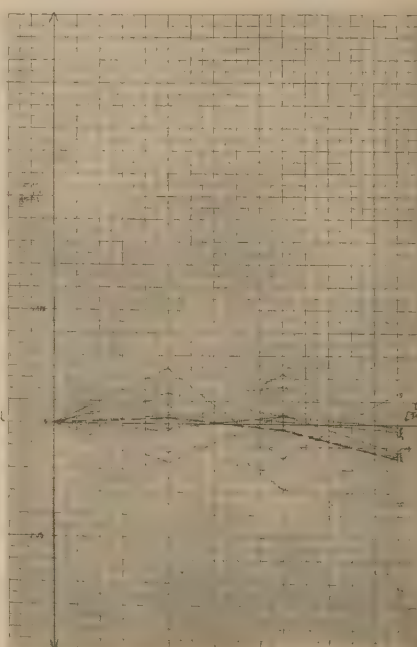
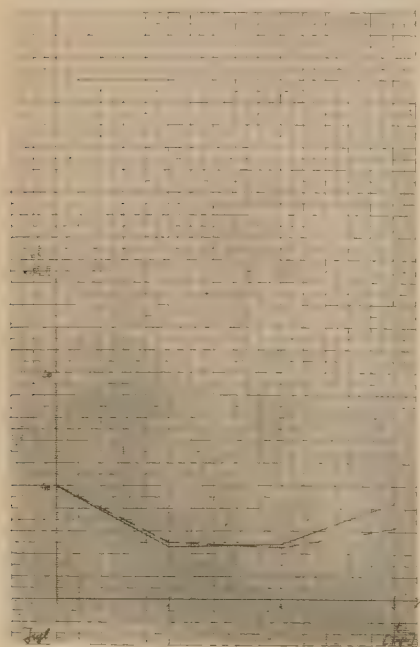
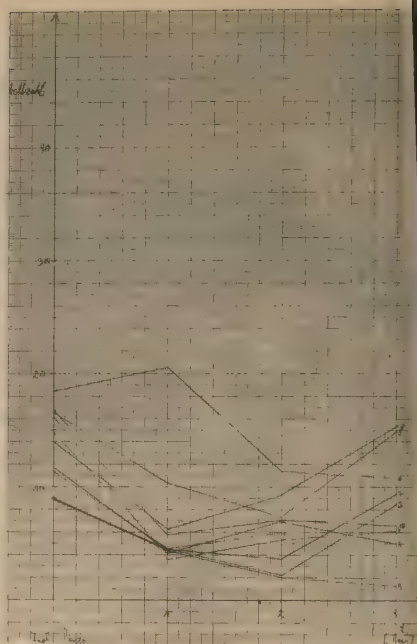
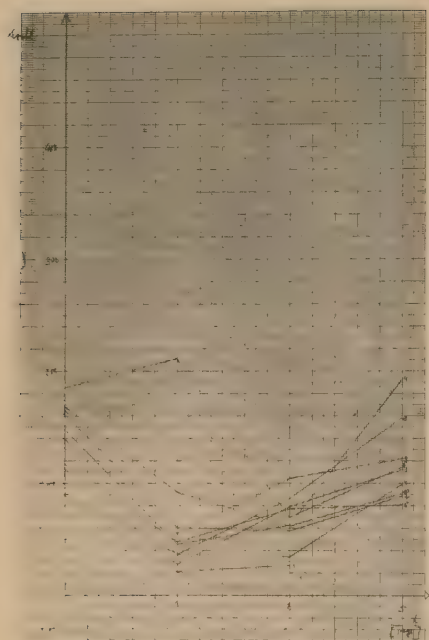


Metamyelocyten.

I. und II. Die Kurven laufen in nicht allzuweiter Entfernung voneinander. Sie haben bei Kontrollen und Versuchen etwa die gleiche Höhe.

III. Die Durchschnittskurven liegen nahe zusammen. Bei drei Tagen liegt die Kurve der Zusatzkulturen etwas mehr unter der Kontrolle.

IV. Die Abweichungen nach oben und unten halten sich die Waage bis nach drei Tagen ein Wert (Kurve 4) besonders stark abfällt und damit die Durchschnittskurve, die bis dahin nahe an der Nulllinie verlief, herunterzieht.

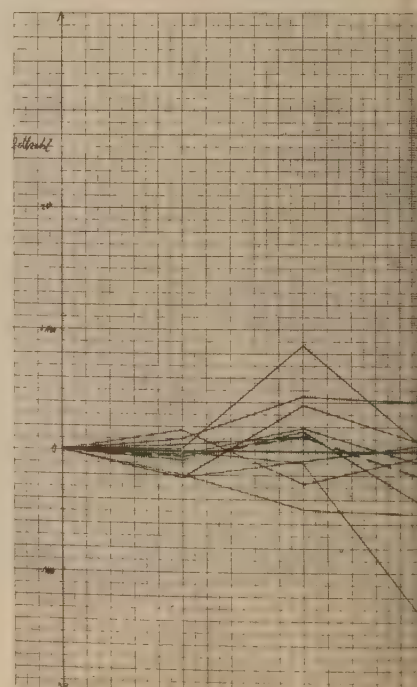
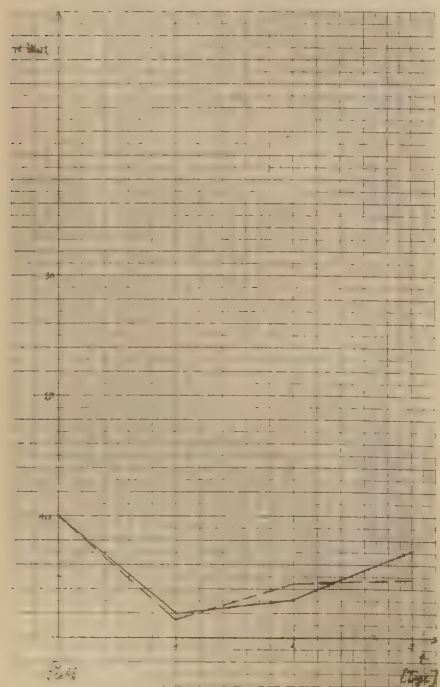
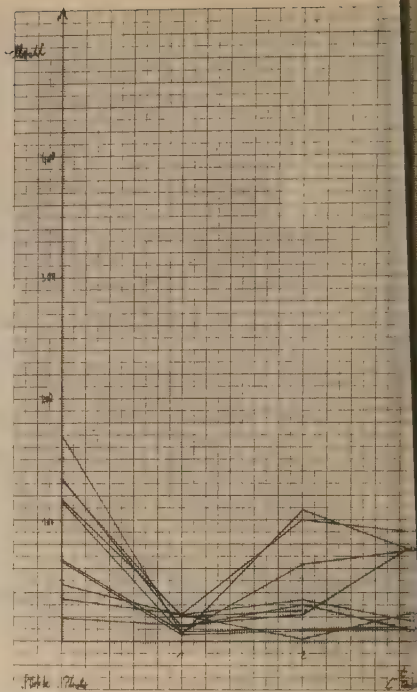
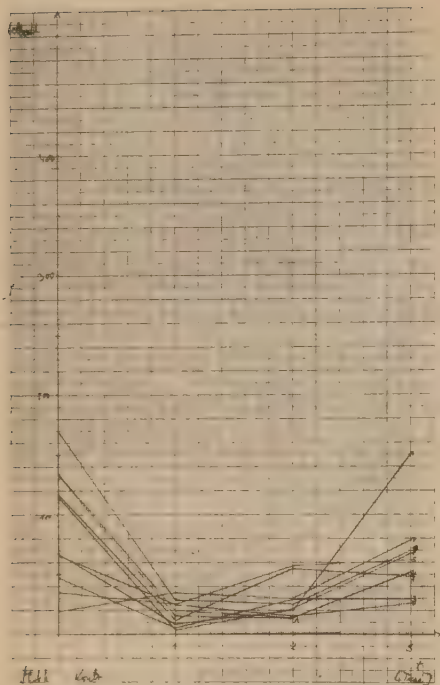


Stabkernige Granulocyten.

I. und II. Nach stärkeren Differenzen in der Zellzahl zu Beginn gehen die Kurven nach einem Tag ziemlich eng zusammen, um dann, besonders in den PHA-Zusatzkulturen, wieder mehr auseinanderzuweichen. Die meisten Kurven laufen, wenn man die Kontrollen mit den Versuchen vergleicht, in ungefähr der gleichen Höhe, nur bei zwei Tagen liegen die Kurven der Zusatzkulturen höher.

III. Die Mittelwertskurven weichen nicht weit voneinander.

IV. Bei den sonst nach oben und unten sich ziemlich ausgleichenden Kurven fällt auf, dass eine Kurve (4) nach drei Tagen deutlich stärker abfällt als die anderen.

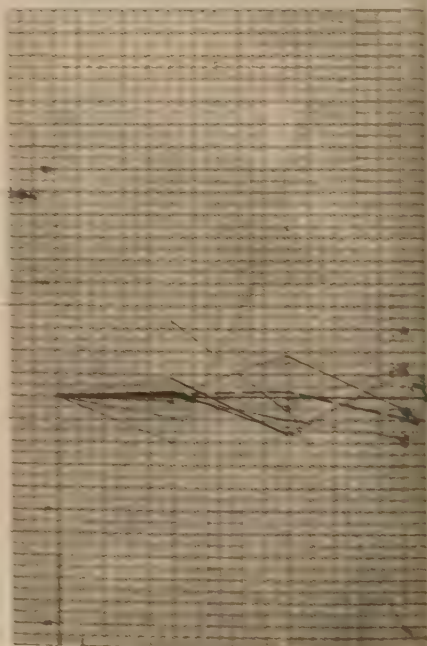
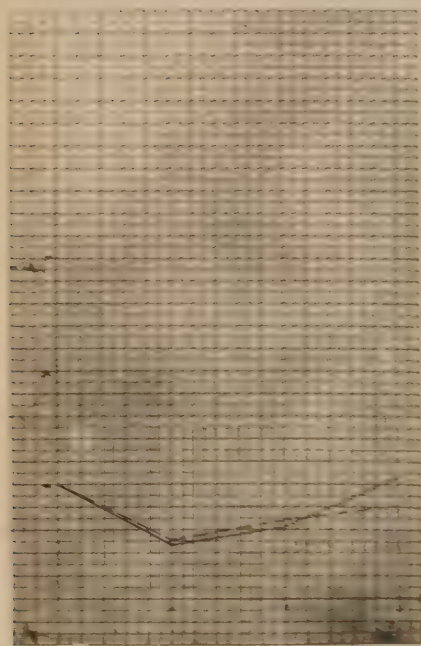
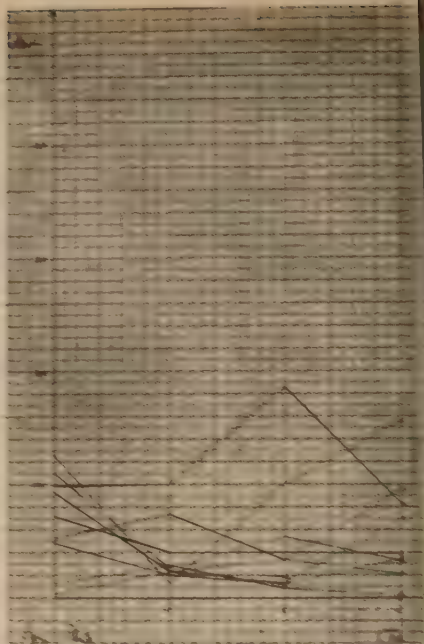
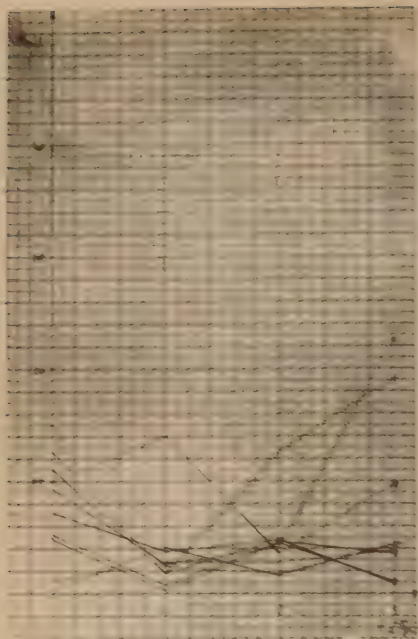


Neutrophile segmentkernige Granulocyten.

I. und II. Die Kurven der Zusatzkulturen verlaufen annähernd auf dem gleichen Niveau wie die der Kontrollkulturen.

III. Die beiden Durchschnittskurven laufen nahe beieinander.

IV. Bis auf eine Kurve (4), die nach drei Tagen sehr stark abfällt, gleichen sich die Abweichungen nach beiden Richtungen aus. Dementsprechend verläuft die Durchschnittskurve nahe an der Nulllinie und fällt nur bei drei Tagen etwas stärker ab.

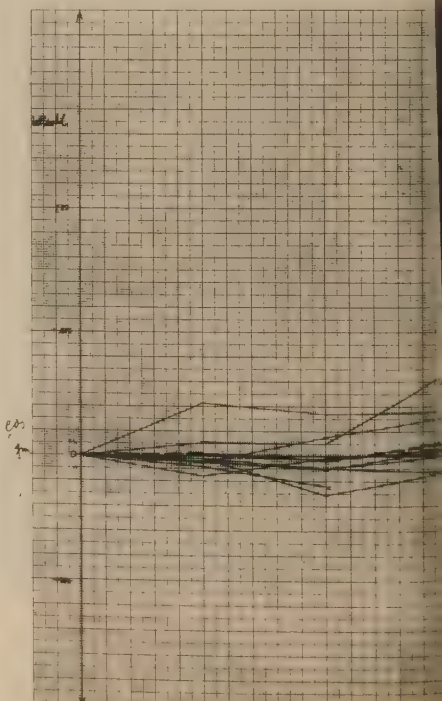
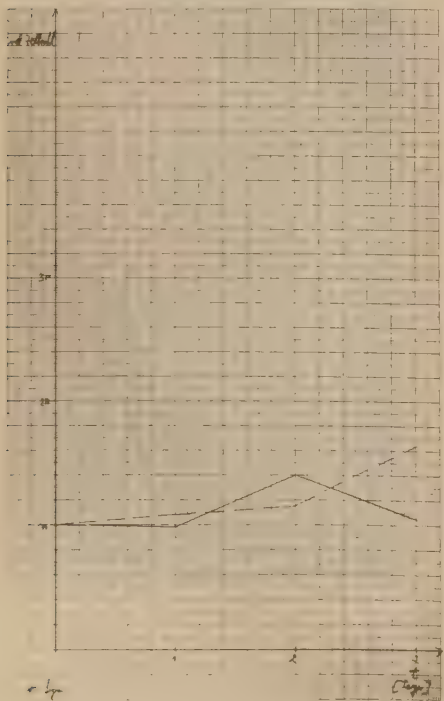
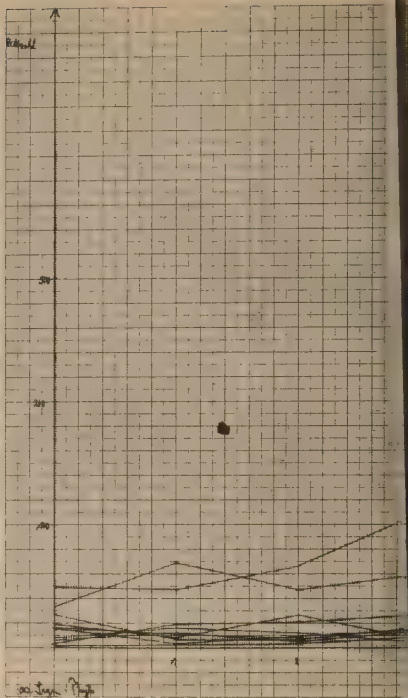
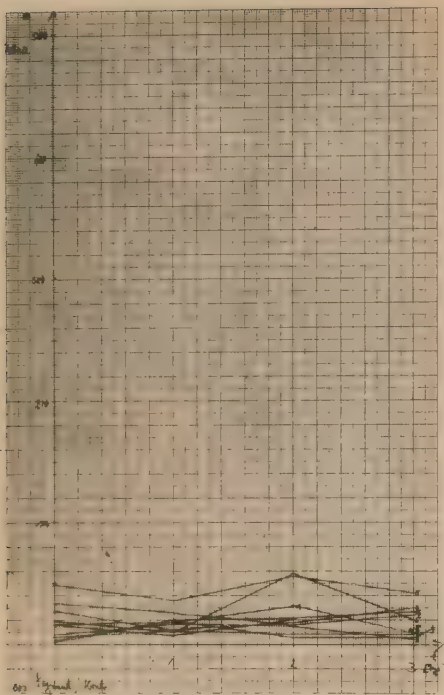


Eosinophile segmentkernige Granulocyten.

I. und II. Die meisten Kurven laufen dicht beieinander und für die Kontrollen und Zusatzkulturen etwa auf gleicher Höhe. Lediglich zwei Kurven bei den Zusatzkulturen (2 und 5) sind deutlich über das Niveau der anderen angehoben.

III. Die beiden Kurven entfernen sich nicht weit voneinander, nur bei drei Tagen liegt die der PHA-Kulturen deutlich über der Kontrollkurve. Diese Erhöhung wurde hervorgerufen durch die beiden von der Norm nach oben abweichenden Kurven 2 und 5.

IV. Die Abweichungen nach oben und unten gleichen sich weitgehend aus, nur bei drei Tagen liegt die Durchschnittskurve deutlicher über der Nulllinie.

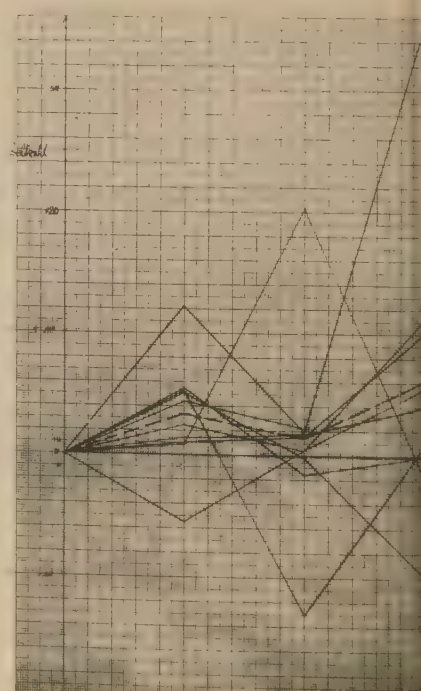
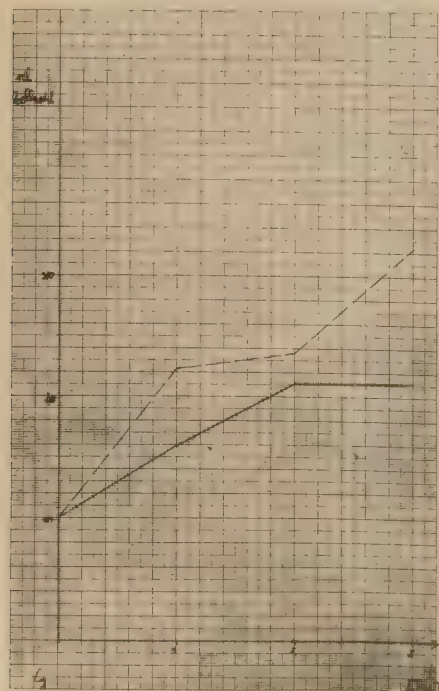
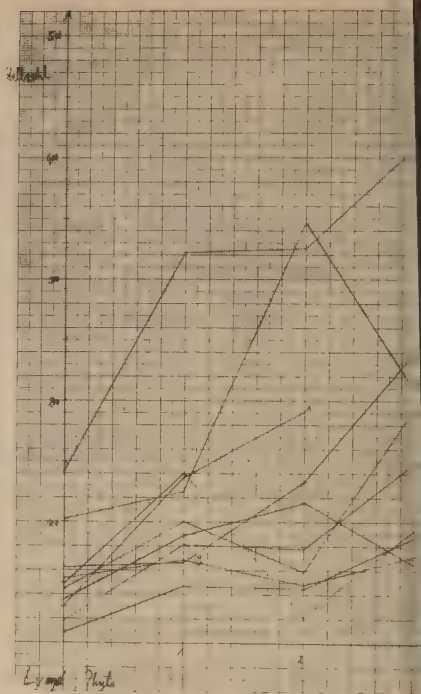
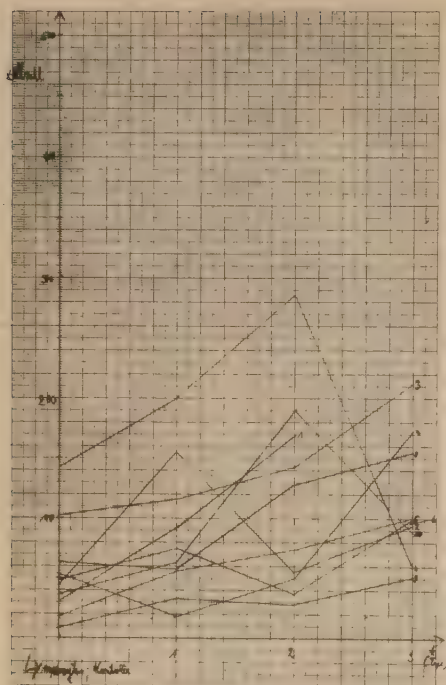


Lymphocyten.

I. und II. Die Anfangszahlen zeigen nicht unerhebliche Differenzen. Im Laufe der Zeit werden diese Unterschiede noch verstärkt. Besonders bei den PHA-Kulturen steigen die Werte bisweilen stark an. Die Kurven liegen aber bei den Zusatzkulturen im allgemeinen nicht höher als bei den Kontrollen.

III. Die Durchschnittskurve der PHA-Kulturen liegt auf einem höheren Niveau als die der Kontrollen. Besonders bei drei Tagen entfernt sie sich mehr von dieser. Eliminiert man die extrem hoch verlaufende Kurve 4 so liegt die Kurve der PHA-Kulturen nach einem Tag nur noch 44% und nicht mehr 64%, nach zwei Tagen nur noch 24% und nicht mehr 25% und nach drei Tagen nur noch 44% und nicht mehr 112% höher als die der Kontrollen.

IV. Die Abweichungen der Verteilungszahlen der Lymphocyten in den PHA-Kulturen von den Kontrollkulturen sind groß. Es kommen jedoch zu jeder Zeit auch Abweichungen nach unten vor, so dass die Mittelwertskurve nur noch nach einem Tag mit 21,6 und nicht mehr mit 33,8, nach zwei Tagen mit 11,7 und nicht mehr mit 13,6 und nach drei Tagen mit 22,4 und nicht mehr mit 62,1 Zellen über der Nulllinie liegt.



Berechnung der Signifikanz der Differenz der Lymphocyten-
zahlen in den Kontrollen gegenüber den PHA-Kulturen
nach einem Tag und nach drei Tagen. (Studenttest)

X = Zahl der Lymphocyten in den einzelnen Kulturen;
geteilt durch 100

N = Zahl der gezählten Kulturen.

Eintageswert:

<u>Kontrolle</u>		<u>PHA-Kulturen</u>	
X	X ²	X	X ²
0,92	0,85	1,36	1,85
1,55	2,40	1,00	1,00
1,66	2,75	1,25	1,56
2,00	4,00	3,22	10,19
0,56	0,31	0,81	0,66
0,75	0,56	1,40	1,96
0,18	0,03	0,69	0,48
0,57	0,32	0,67	0,45
0,33	0,11	0,47	0,22
<u>0,63</u>	<u>0,40</u>	<u>1,16</u>	<u>1,34</u>
= 8,65	11,73 = S (X ²)	S (X)=12,03	19,71=S (X ²)

$$\bar{X} = \frac{S(X)}{N}$$

$$= \frac{8,65}{10}$$

$$\bar{X} = 0,865$$

=====

$$s = \sqrt{\frac{S(X^2) - \bar{X} S(X)}{N - 1}}$$

$$= \sqrt{\frac{11,73 - 7,47}{9}}$$

$$s = 0,69$$

=====

$$\bar{X} = \frac{12,03}{10}$$

$$\bar{X} = 1,203$$

=====

$$s = \sqrt{\frac{19,71 - 14,5}{9}}$$

$$s = 0,76$$

=====

Kontrolle

PHA

$$\bar{x}_1 = 0,865$$

$$\bar{x}_2 = 1,283$$

$$s_1 = 0,69$$

$$s_2 = 0,76$$

$$N_1 = 10$$

$$N_2 = 10$$

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{(N_1-1)s_1^2 + (N_2-1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{N_1}{N_1} + \frac{N_2}{N_2}}$$

$$= \frac{0,338}{\sqrt{\frac{0,478 + 0,580}{2 \cdot 5}}}$$

$$= \frac{0,338}{\sqrt{0,1058}}$$

$$= \frac{0,338}{0,325}$$

$$t = 1,04$$

=====

Dreitagewert:

Kontrolle:

X	X ²
0,94	0,88
2,12	4,50
0,6	0,36
1,01	1,01
1,00	1,00
1,72	2,96
1,55	2,41
0,51	0,26
0,89	0,79

PHA

X	X ²
2,06	4,25
1,95	3,80
4,18	17,50
1,56	2,43
1,00	1,00
0,74	0,55
2,51	6,30
0,91	0,83
0,97	0,94

$$\sum(X) = 10,34 \quad 14,17 = S(X^2) \quad S(X) = 15,88 \quad 37,60 = S(X^2)$$

$$\bar{X} = \frac{10,34}{9}$$

$$\bar{X} = \frac{15,88}{9}$$

$$\bar{X} = 1,15$$

$$\bar{X} = 1,763$$

$$s = \sqrt{\frac{14,17 - 11,79}{8}}$$

$$s = \sqrt{\frac{37,6 - 28}{8}}$$

$$s = \sqrt{\frac{2,38}{8}}$$

$$s = \frac{9,6}{8}$$

$$s = 0,546$$

$$s = 1,2$$

Kontrolle

$$\bar{x} = 1,15$$

$$s_1 = 0,546$$

$$N_1 = 9$$

PHA

$$\bar{x}_2 = 1,763$$

$$s_2 = 1,2$$

$$N_2 = 9$$

$$t = \frac{0,613}{\sqrt{\frac{0,298 + 1,44}{8}}}$$

$$= \frac{0,613}{\sqrt{\frac{1,738}{8}}}$$

$$= \frac{0,613}{\sqrt{0,217}}$$

$$= \frac{0,613}{0,465}$$

$$t = 1,32$$

=====

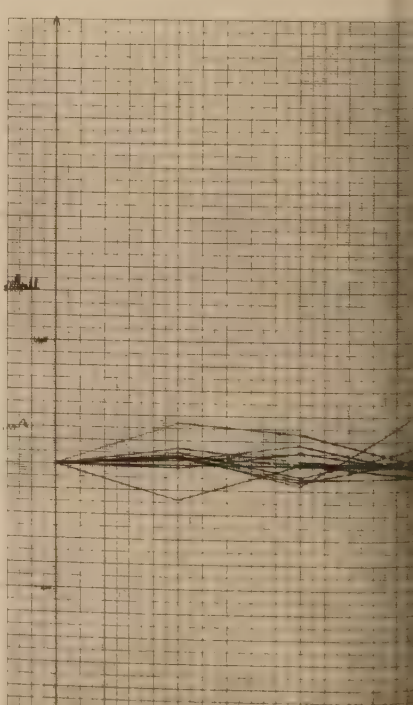
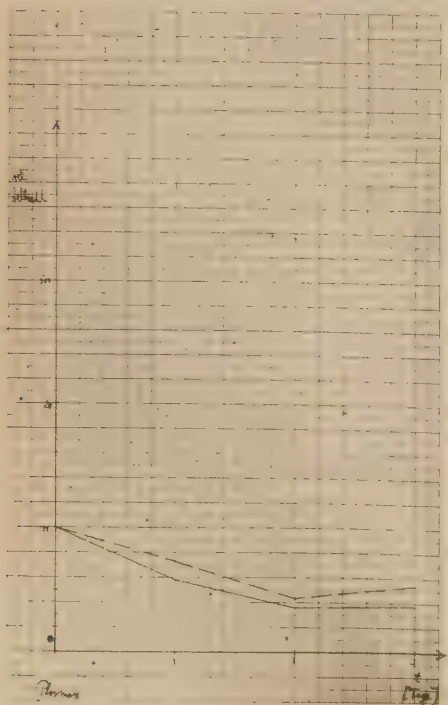
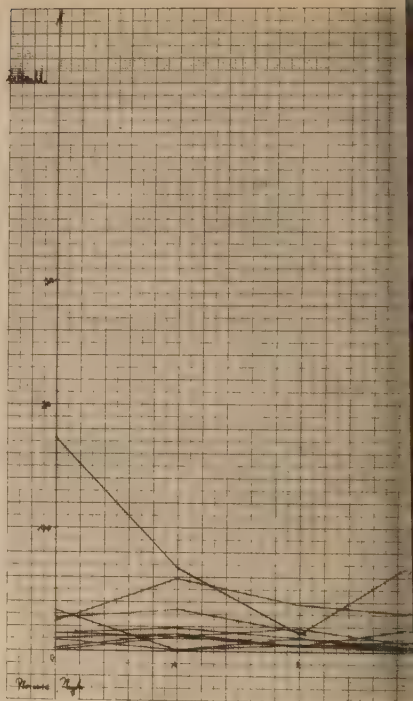
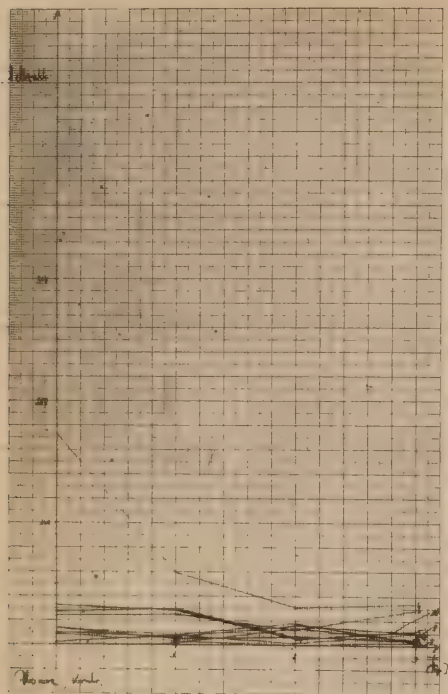
Um signifikant zu sein, müßte t den Wert 2,3 erreichen (P = 5%). Nach ein und nach drei Tagen ist also der Unterschied in den Lymphocytenzahlen in den Kontrollen gegenüber den PHA-Kulturen nicht signifikant.

Plasmazellen.

I. und II. Bis auf einen Fall mit Plasmocytom (6) verlaufen die Kurven niedrig und beisammen.

III. Die Mittelwertskurve der PHA-Kulturen liegt nur gering über der der Kontrollen.

IV. Die Abweichungen nach beiden Richtungen halten sich die Waage, so dass die Durchschnittskurve nur wenig von der Nulllinie abweicht.

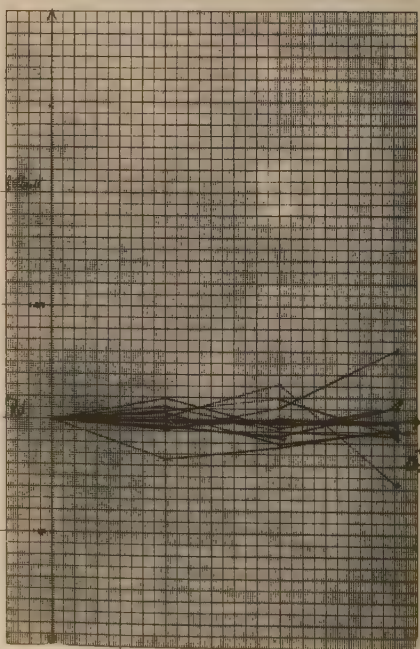
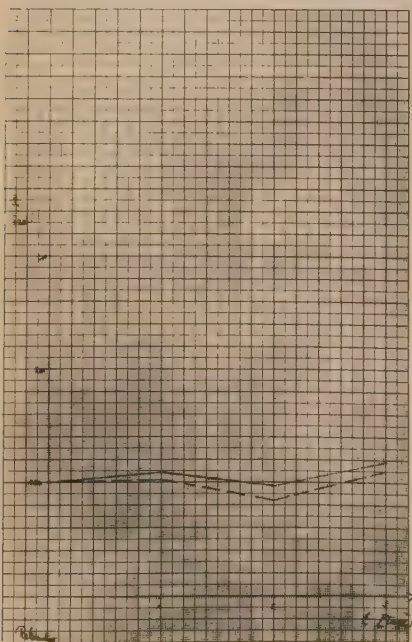
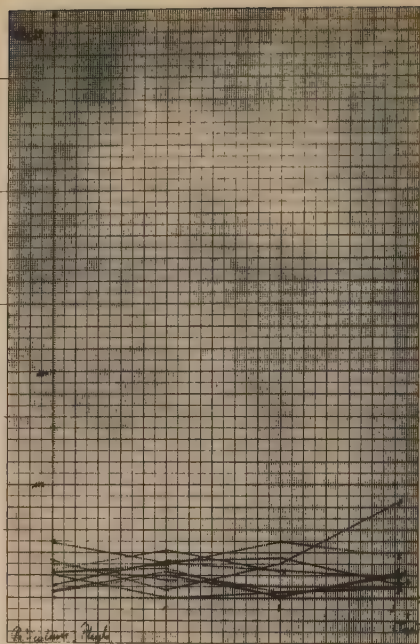
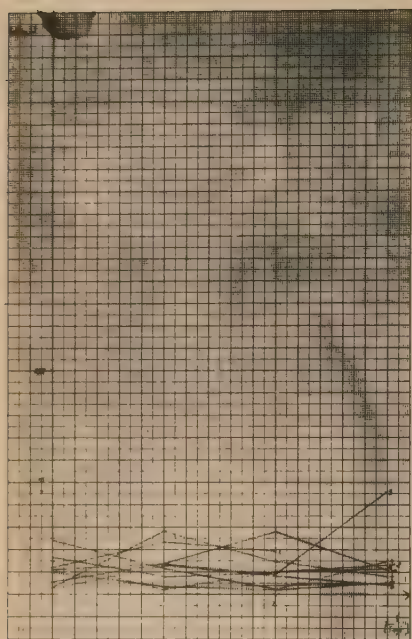


Lymphoide und phagocytierende Reticulumzellen.

I. und II. Die Kurven verlaufen niedrig und beisammen.

III. Die Mittelwertskurven verlaufen eng beisammen.

IV. Die Abweichungen nach oben und unten gleichen sich aus.



III. Um die Einwirkungen des PHA auf die Mitosehäufigkeit darzustellen, errechneten wir den Mitoseindex der Erythropoese und Granulopoese für die einzelnen Kulturen, d.h. die Zahl der sich teilenden Zellen bezogen auf 1000 teilungsfähige Zellen.

In der gewählten Form der Darstellung in Säulen für jeden Ausstrich bestimmt die Höhe der Säule die Größe des Mitoseindex. Die ungemusterten Säulen entsprechen den Präparaten ohne Zusatz, die schraffierten denen mit PHA-Zusatz.

Die Höhe des Mitoseindex zu den sich entsprechenden Zeiten schwankt von Ausstrich zu Ausstrich. Die Schwankungen der Mitoseindices der roten Reihe sind bedeutend größer als bei der weissen Reihe, bei der der Mitoseindex seltener bis auf Null herabgeht, wahrscheinlich wegen zu kleiner Zahlen.

Die Säulen der PHA-Kulturen liegen einmal über und ein anderes Mal wieder unter den entsprechenden Kontrollwerten. Eine einheitliche Tendenz ist nicht festzustellen.

Aus den Darstellungen der mittleren Mitoseindices kann man entnehmen, dass in der weissen Reihe die Mitoseindices

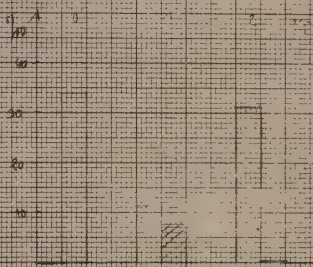
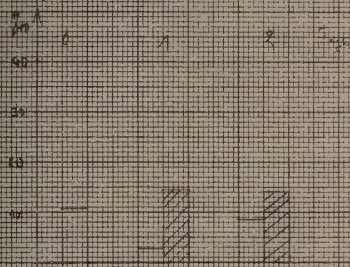
der PHA-Kulturen nach einem Tag allgemein etwas über den Kontrollen liegen. Am zweiten Tage gleichen sie sich jedoch den Kontrollen an und liegen am dritten Tage etwas darunter.

1000000

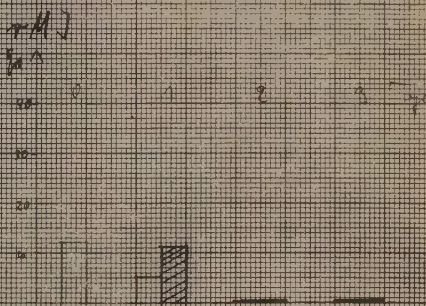
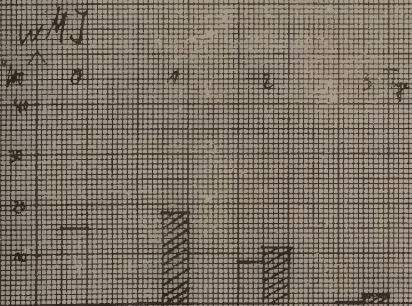
1000000

1000000

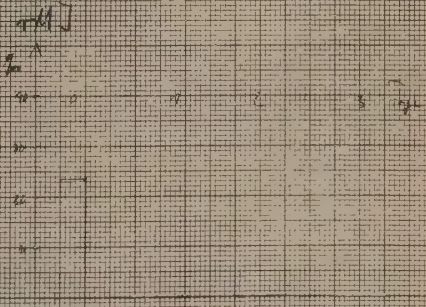
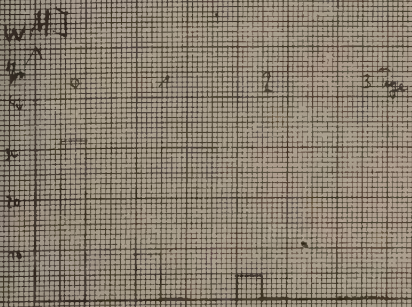
1000000

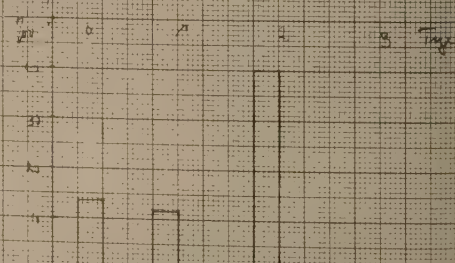
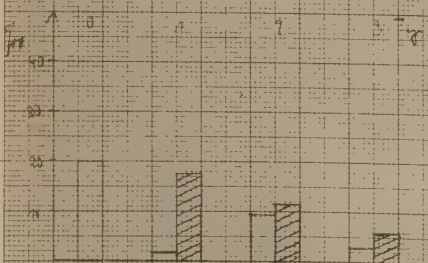
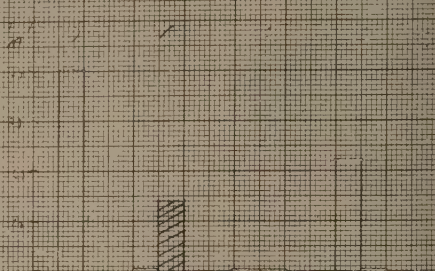


1000000



1000000



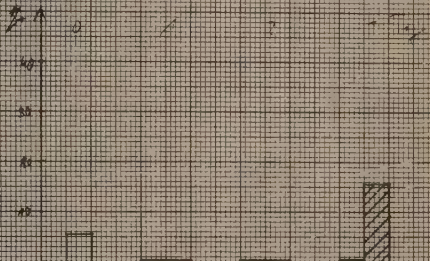


2 Patient

WMS



WMS

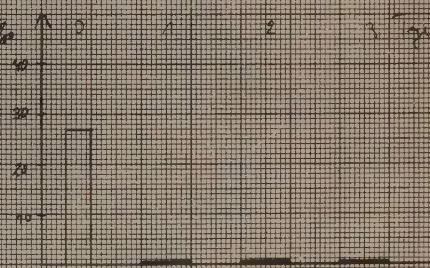


3 Patient

WMS

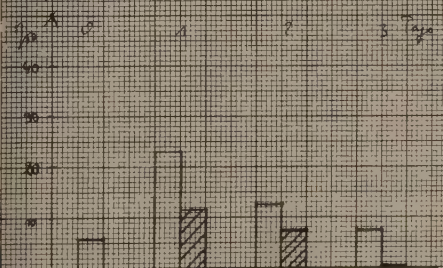


WMS

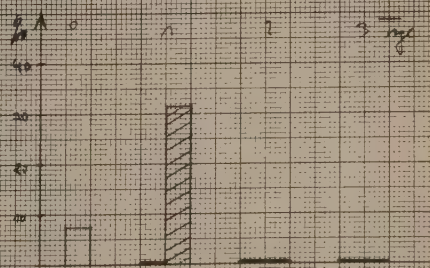


3 Patient

WMS

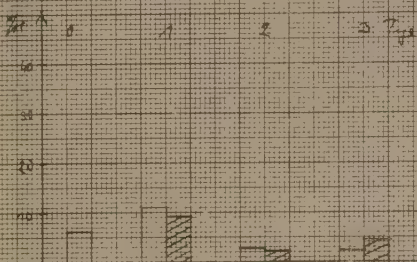


WMS

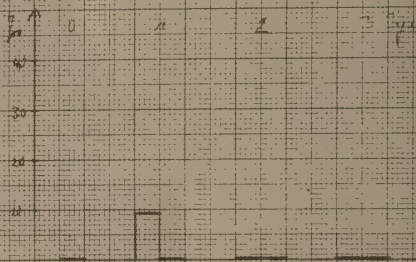


10. 2. 1964

WMJ



rMJ

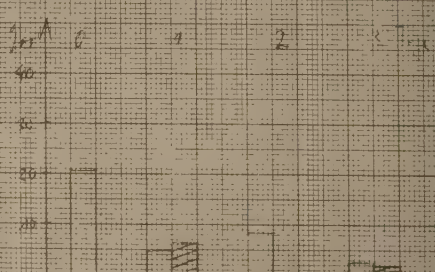


Durchschnittliche Abtorehäufigkeit

WMJ



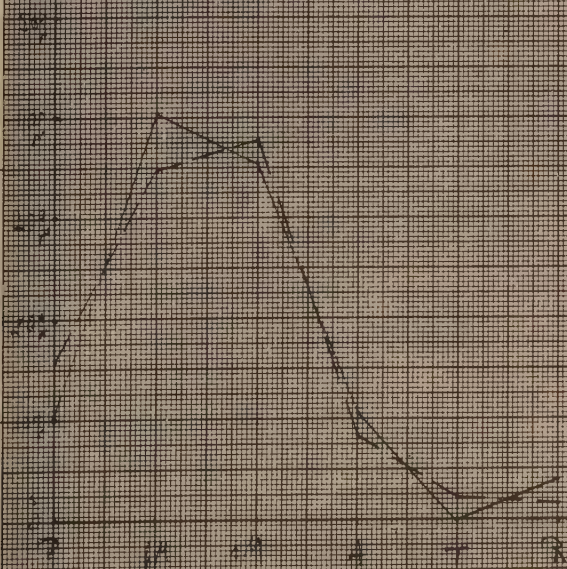
rMJ



Vestibular Nerve Test

— Control (amplitude 79 μ V)

— Post-kalium amplitud 35 μ V



Berechnung der Signifikanz des Unterschiedes der durchschnittlichen Mitose indices der Granulopoese zwischen Kontrollen und PHA-Kulturen nach einem Tag (Studenttest).

N_1 = Zahl der teilungsfähigen Zellen in den Kontrollen

N_2 = Zahl der teilungsfähigen Zellen in den

PHA-Kulturen

$$N = N_1 + N_2$$

a_1 = Zahl der Mitosen in den Kontrollen

a_2 = Zahl der Mitosen in den

PHA-Kulturen

$$a = a_1 + a_2$$

$$b_1 = N_1 - a_1$$

$$b_2 = N_2 - a_2$$

$$b = b_1 + b_2$$

Kontrollen

$$a_1 = 6,9$$

$$b_1 = 993,1$$

$$N_1 = 1000$$

PHA

$$a_2 = 10$$

$$b_2 = 990$$

$$N_2 = 1000$$

$$t = \frac{(a_1 b_2 - a_2 b_1)}{\sqrt{\frac{a b N_1 N_2}{N}}}$$

$$= \frac{6970 - 9931}{\sqrt{\frac{16,9 \cdot 1983,1 \cdot 1000 \cdot 1000}{2000}}}$$

$$= \frac{2961}{\sqrt{16750 \cdot 1000}}$$

$$t = \frac{2961}{4090}$$

$$t = \underline{\underline{0,725}}$$

Um signifikant zu sein, müßte t den Wert 1,96 erreichen (P = 5%).

Der Unterschied der Mitose indices ist also nicht signifikant.

In der Erythropoese liegen die Mittelwerte der PHA-Kulturen nach einem Tag ebenfalls etwas über den Kontrollen, sinken nach zwei Tagen auf Null ab und werden am dritten Tage wieder bemerkt, bleiben jedoch dann unter den Kontrollwerten.

Es wurden keine Mitosen von Lymphoblasten oder Lymphocyten gesehen.

Die Mitosephasenverteilung wurde durch PHA kaum verändert (Abb.49e)

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Das PHA wirkt in der menschlichen KM-Kultur nicht verändernd auf die Zellmorphie ein.

Eine Umwandlung von Lymphocyten in Lymphoblasten findet während unserer drei Beobachtungstage nicht statt. Die prozentuale Verteilung der Zellen ändert sich nicht unter dem Einfluss von PHA. Lediglich die Lymphocyten und die eosinophilen segmentkernigen Granulocyten sind nach drei Tagen leicht vermehrt. Die Zahl der Plasmazellen und Retikulumzellen scheint nicht unter Einfluß von PHA verändert zu sein.

Die Zahl der Mitosen wurde durch PHA nicht signifikant erhöht.

Diskussion.

Zu den in der Einleitung gestellten Fragen möchten wir unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse wie folgt Stellung nehmen:

I. Treten unter dem Einfluß von PHA morphologische Veränderungen an irgendeiner Zellart auf?

EPSTEIN (11) hat nachweisen können, dass Lymphocyten unter Einwirkung von PHA zuerst ihre RNS-Synthese und später auch ihre DNS-Synthese verstärken. In Blutkulturen beobachteten ASTALDI (4) u.a. mit PHA-Zusatz nach 2 - 3 Tagen eine Grössenzunahme der Lymphocyten und eine Umwandlung erst in Prolymphocyten und dann in Lymphoblasten. Diese beobachtete Grössenzunahme der Lymphocyten ist gut mit dem vermehrten RNS-Einbau in Einklang zu bringen.

Unter dem Einfluß von PHA sind also Umwandlungen von reifen Zellformen, Lymphocyten, in unreife, wieder teilungsfähige Zellformen, Lymphoblasten, festgestellt worden. Die Umwandlung von reifen Zellen in wieder teilungsfähige Zellen entspricht den Befunden einer vermehrten DNS-Synthese.

Wir haben in den Knochenmarkkulturen von Menschen nicht

beobachten können, dass unter dem Einfluss von PHA sich in irgendeiner Zellreihe reife Zellen in unreife Zellen zurückverwandelt haben. Nach drei Tagen, als die Wirkung von PHA sich bemerkbar gemacht haben müßte, liegen die Zellzahlen der unreifen, teilungsfähigen Zellen meist unter den Ausgangswerten der Originalausstriche. In keinem Fall aber sahen wir bei diesen Zellen einen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen mit und ohne PHA-Zusatz in dem Sinne, dass die unreifen Zellen in den PHA-Kulturen zahlreicher als in den anderen anzutreffen wären. (s. auch III)

Lymphoblasten, insbesondere wurden bei 68 000 gezählten Zellen überhaupt nur 5 beobachtet. Eine vermehrte Umwandlung von Lymphocyten in Lymphoblasten ist also in unseren KM-Kulturen sicher nicht vorgekommen.

II. Läßt sich eine Wirkung von PHA auf die Mitosehäufigkeit und Mitosephasenverteilung in den Kulturen feststellen?

NOWELL (3) meint, dass die Wirkung des PHA eventuell so zu erklären sei, dass es nicht direkt die mitotische Teilung der Zelle einleite, sondern dass es die Zellen lediglich in einen teilungsfähigen Zustand überführe.

Unsere Ergebnisse sprechen für diese Annahme, denn nach dem Ausbleiben der Umwandlung von reifen, "teilungsunfähigen" Zellen in unreife, teilungsfähige Zellen bleibt folgerichtig auch die Steigerung der Mitosehäufigkeit in unseren Kulturen unter PHA aus. Lediglich nach einem Tag liegen die Mitoseindices der weissen Reihe in den PHA-Kulturen etwas über den Werten der Kontrollen (10% in den PHA-Kulturen gegenüber 6,9% in den Kontrollen). Diese Differenz ist jedoch nicht signifikant (s. Signifikanzberechnung in den Ergebnissen). Die Steigerung der Mitoseaktivität in den Blutkulturen der verschiedenen Autoren unter PHA ist zudem viel höher (von 0 Mitosen zu 0,5 - 1% Mitosen unter PHA bei NOWELL (3), bzw. von 0 bis zu 1 - 2% unter PHA bei ST. PAUL). Außerdem halten sich bei uns die beiden Mitoseindices nach zwei Tagen schon wieder die Waage, und nach drei Tagen liegen die der PHA-Kulturen sogar unter denen der Kontrollen. Zu dieser Zeit beginnt aber erst die eigentliche Steigerung der Mitosehäufigkeit in den Blutkulturen.

Die Unterschiede der Mitoseindices zwischen PHA-Kulturen und Kontrollen in der roten Reihe sprechen ebenfalls nicht für eine Steigerung der Mitosehäufigkeit durch PHA.

Eine Zellteilung von Lymphocyten konnten wir nicht beobachten, auch nicht in den PHA-Kulturen. Von den 5 gezählten Lymphoblasten befand sich keiner in Mitose.

Durch den PHA-Zusatz zu unseren Knochenmarkkulturen ist die Mitoseaktivität der Zellen allgemein und speziell auch der Lymphocyten und Lymphoblasten nicht gesteigert worden. Eine Änderung der Mitosephasenverteilung durch PHA war nicht sehr wahrscheinlich und ist auch nicht eingetreten.

III. Ändert PHA die prozentuale Verteilung der Zellen in den Versuchen gegenüber den Kontrollen?

Wir haben festgestellt, dass die mitotische Aktivität in unseren Zellkulturen durch PHA nicht gesteigert wurde. Infolgedessen ist auch nicht zu erwarten, dass eine Zellart ihre absolute Zellzahl unter PHA-Einwirkung erhöht hat. Veränderungen der Verteilungszahlen können dann nur noch zustande gekommen sein entweder durch ein vermehrtes Absterben bestimmter Zellarten unter PHA-Einfluss, wodurch dann andere Zellarten zahlenmäßig mehr in den Vordergrund treten, also nur relativ vermehrt sind, oder durch die Umwandlung einer Zellart in eine andere, wie etwa Lymphocyten über Prolymphocyten in Lymphoblasten. Diese Möglichkeit ist schon in Punkt I.

abgehandelt und für unsere Kulturen abgelehnt worden.

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, dass PHA auf die Verteilungszahlen der Zellen in Knochenmarkkulturen keinen Einfluss ausübt. Es schlägt sich also weder eine gesteigerte mitotische Vermehrung von Zellen, noch eine Umwandlung einer Zellart in eine andere, noch ein auffälliges Absterben einer bestimmten Zellart unter dem Einfluss von PHA in unseren Ergebnissen nieder. Die Verteilungszahlen gleichen sich im wesentlichen in den PHA-Kulturen und Kontrollen. Lediglich bei den Lymphocyten sieht man nach einem und nach drei Tagen ein etwas stärkeres Ansteigen der Zellzahlen der PHA-Kulturen gegenüber denen der Kontrollen. Diese Veränderungen sind jedoch nicht signifikant (s. Signifikanzberechnung in den Ergebnissen), beruhen also höchstwahrscheinlich auf einer zufällig anderen Zellverteilung in den Kulturen, die nicht durch PHA bedingt ist. Nicht unwesentlich werden diese Abweichungen sicherlich durch die in den Zellzahlen sehr von den anderen nach oben abweichende 4. Kultur beeinflusst.

In allen von uns durchgeführten Untersuchungen erwies sich also das PHA als wirkungslos auf Knochenmarkkulturen.

Wie ist dieses Ausbleiben jeglicher Wirkung des PHA zu erklären? Gehen wir von der Vorstellung NOWELLS aus, der glaubt, dass das PHA nicht die mitotische Zellteilung selbst einleitet, sondern die Zellen nur in einen mitosebereiten Zustand überführt, so könnte man argumentieren, dass ja im Knochenmark die Zellen sich zu einem großen Teil in einem mitosebereiten Zustand befinden und dass es gar keines Mittels bedarf, sie in einen solchen Zustand zu überführen.

Es ist also von vornherein aussichtslos, mit einer Substanz wie PHA Knochenmarkkulturen zu erhöhter mitotischer Aktivität anregen zu wollen.

Es sei hier erwähnt, dass es NOWELL (22) aber möglich war, auf einem anderen Wege die mitotische Aktivität von Knochenmarkkulturen anzuregen. Er behandelte hierzu Knochenmarkkulturen mit Serum von mit Staphylokokken infizierten Ratten und beobachtete danach eine Steigerung der Zahl der Mitosen in diesen Kulturen. Der gleiche Erfolg konnte auch von HAMANN mit Östronsulfat erzielt werden (23).

Man kann also nicht sagen, dass es generell nicht möglich ist, die mitotische Aktivität von Knochenmarkkulturen zu steigern. Nur mit PHA ist es eben nicht möglich. Die Gründe dafür sind uns unbekannt. Vielleicht

greifen Substanzen, die eine Erhöhung der mitotischen Aktivität von Knochenmarkkulturen bewirken, in die Vorgänge ein, die direkt die Mitose der Zelle einleiten, während PHA die Zellen durch die Aktivierung der RNS-Synthese nur für die Mitose vorbereitet, wie NOWELL es vermutet. So könnte man sich erklären, dass PHA auf die schon mitosebereiten Zellen des Knochenmarkes nicht wirkt, während andere Substanzen auch hier noch eine Steigerung der Mitosezahlen durch eine sofortige Einleitung der bevorstehenden Mitosen hervorrufen können.

Aus den Arbeiten der verschiedenen Autoren geht hervor, dass die Granulocyten in Blutkulturen schon nach einem Tag verschwunden waren. Die Lymphocyten blieben übrig. Sie waren somit die einzigen Zellen, an denen sich eine Wirkung des PHA manifestieren konnte.

In unseren Knochenmarkkulturen waren aber nach drei Tagen noch fast alle im Originalausstrich bemerkten Zellen vorhanden. Es wäre also durchaus möglich gewesen, dass sich eine PHA-Wirkung auch an diesen Zellen gezeigt hätte.

Aus diesem Grunde haben wir in unsere Betrachtungen bisher alle in unseren Kulturen vorkommenden Zellen einbezogen. Die Möglichkeit einer Reaktion auch der anderen

Zellen auf PHA ist jedoch nicht eingetreten, und wir wollen nun deshalb speziell das Verhalten der Lymphocyten unter PHA-Einwirkung betrachten.

ASTALDI (24) hat beobachtet, dass in seinen Blutkulturen von Blut gesunder Menschen nicht alle Lymphocyten die beschriebene Reaktion auf PHA zeigten, sondern dass ständig eine gewisse Anzahl von Lymphocyten völlig unverändert blieb, etwa 25 - 35% (25). Ferner bemerkte ASTALDI, dass bei Blutkulturen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie nur etwa 10% der Lymphocyten die erwähnten Veränderungen auf PHA zeigten, während die übrigen 90% ihr übliches normales Aussehen behielten (25).

FISCHER und GROPP stellten ebenfalls fest, dass ihre Versuch-e einer Kultivierung in vitro von Lymphocyten bei Lymphadenosefällen teilweise eine herabgesetzte bis fehlende Transformationsfähigkeit der Lymphocyten ergaben (26).

ASTALDI glaubte, dass es sich bei den auf PHA reagierenden Zellen um junge, noch entwicklungsfähige Zellen handelt, während er die unveränderten Lymphocyten für alte, vollkommen ausgereifte Zellen hielt.

Bei chronisch lymphatischer Leukämie findet man aber mehr chronologisch alte Zellen als im gesunden Blut, und eben deshalb meinte ASTALDI, zeigt hier ein größerer Anteil von Lymphocyten als im normalen Blut keine für PHA typischen Veränderungen.

Träfe diese Vermutung ASTALDIS zu so könnte man folgern, dass die Lymphocyten im Knochenmark älter sind als die Lymphocyten im Blut. Dafür bietet sich aber sonst kein Anhalt, und auf entsprechende Untersuchungen über das Alter der Lymphocyten im Knochenmark können wir uns nicht stützen.

PAPAO und ROSE (27) haben festgestellt, dass PHA im lebenden Organismus bei Mäusen nicht die beschriebenen Wirkungen entfaltet. Möglicherweise kann der lebende Organismus PHA sehr schnell eliminieren, und vielleicht wohnt diese Fähigkeit auch dem Knochenmark inne, nicht jedoch dem isolierten normalen menschlichen Blut, sodass PHA in Knochenmarkkulturen nicht wirksam werden kann, in Blutkulturen jedoch einen Effekt hervorruft.

Wir halten es durchaus für möglich, dass der unterschiedliche Effekt des PHA auf Blut- und Knochenmarkkulturen auf dem Vorhandensein eines Faktors beruht, der entweder nur in der Blutkultur oder nur in der Knochenmarkkultur vorkommt.

Befindet sich dieser hypothetische Faktor im Knochenmark oder in der Knochenmarkkultur, so geht er vielleicht mit dem PHA eine unwirksame Verbindung ein; befindet sich der Faktor im Blut oder in der Blutkultur, so wird durch seine Verbindung mit dem PHA vielleicht erst die eigentlich wirksame Verbindung geschaffen. Ebenso gut wäre es auch möglich, dass PHA dieser hypothetischen Substanz durch eine Membranpermeabilitätsänderung den Eintritt in die Zelle ermöglicht, in der sie dann ihre Wirkung entfaltet, sodass PHA eigentlich nur indirekt für die beschriebenen Wirkungen verantwortlich wäre (3, 9, 15). Auch bei der in der Einleitung erwähnten Agglutination der Erythrocyten wirkt das PHA ja durch eine Veränderung der Zellmembran (1).

Wir wollen nicht unerwähnt lassen, dass wir für unsere Knochenmarkkulturen nicht TC-199 wie NOWELL (3) oder TCM wie FISCHER-GROPP (5) und auch nicht NCTC wie ASTALDI (6) benutzten, weil Knochenmarkkulturen nicht sonderlich gut darauf gedeihen.

Fraglich ist noch, inwieweit die unterschiedlichen Kulturmethode, hier Knochenmarkkulturen in koagulierten Medien, dort Blutkulturen in flüssigen Medien, einen Einfluss auf die PHA-Wirkung haben.

Träfen diese letzten Vermutungen zu, so wäre es wiederum vollkommen offen, ob es sich bei der Wirkung des PHA speziell um ein Problem der Lymphocyten handelt oder ob sich dieses Problem auf alle Zellen in Blut und Knochenmark erstreckt.

Zusammenfassung.

Um die Wirkung von PHA auf Knochenmarkkulturen zu prüfen, wurden Knochenmarkkoagulumkulturen mit und ohne PHA-Zusatz angelegt. Die Kulturen wurden differenziert und die Ergebnisse verglichen in Bezug auf morphologische Veränderungen an den Zellen, Änderung in der Differentialverteilung der Zellen, Mitosehäufigkeit und Mitosephasenverteilung in den Kulturen.

Auf Grund unserer Diff.-Zählungen bis zu drei Tagen können wir sagen, dass PHA keinerlei erkennbare Wirkung auf Knochenmarkkulturen ausübt. Es wandeln sich weder die Lymphocyten in Lymphoblasten um, noch ist eine Steigerung der Mitosehäufigkeit zu beobachten, wie das von verschiedenen Autoren bei Blutkulturen unter dem Einfluss von PHA bemerkt worden ist.

Literaturangaben.

1. Tobieka, J. : Die Phythämagglutinine
Akademie-Verlag Berlin (1964)
2. Tanzer, J. : Culture de cellules à partir du sang
humain suivant les techniques
d'Osgood.
Rev. d' Hémat., 15, 250, (1960).
3. Nowell, P.C. : Phytohemagglutinin: An Initiator of
Mitosis in Cultures of Normal Human
Leukocytes.
Cancer Research 20, 4:462 (1960)
4. Astaldi, G. : Das Phythämagglutinin und das Problem
des Lymphocyten.
Med. Klinik 59, 10 : 368 (1964)
5. Fischer, R. und A. Gropp : Cytologische und cytoche-
mische Untersuchungen an normalen und
leukämischen in vitro gezüchteten
Blutzellen.
Klin. Wschr. 42, 3 : 11 (1964)
6. Astaldi, G., E. Strosseli e S. Sauli : L'effetto della
fitohemagglutinina sui leucociti del
sangue umano normale.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. XXXIX,
10 : 568 (1963)
7. Elves, M.W., J. Gough, J.A. Chapman and M.C.G. Israels:
Elektron microscopie studies of
lymphocytes.
Transformation under the influence
of phytohaemagglutinin.
Lancet 1964, I, 306. Ref. Kgr. Z. 268
3 : 272 (1965)
8. Favier, Y., M. Viëtte, M. Saint-Paul et J.F. Duplan :
Methode simplifiée de culture de leu-
cocytes à partir de sang humain.
Influence de la phaséoline.
Nouvelle Revue Française d' Hématologie.
1, 6 : 872 (1961)

9. Hirschhorn, K., F. Bach, R.L. Kolodny, I.L. Firschein
and N. Hashem : Immune response
and mitosis of human peripheral
blood lymphocytes in vitro.
Science 142, 1185 - 1187, (1963)

10. Marshall, W.H. and K.B. Roberts: The growth and mitosis
of human small lymphocytes after
incubation with a phytohemagglutinin.
Quart. J. exp. Physiol. 48, 146 (1963)
Ref. Kgr. Zbl. 270, 3 : 263 (1965)

11. Epstein, L.B. and F. Stohlman, Jr.: RNA-synthesis in
cultures of normal human peripheral
blood.
Blood 24, 1 : 69 (1964)

12. Cooper, E.H. u.a.: Observations on the proliferation
of human leucocytes cultured with
phytohem-agglutinin.
Brit. J. Haemat. 9, 1 : 101 (1963) -
Ref. Kgr. Zbl. 251, 1 : 56 (1963)

13. Permain zitiert aus: Dela Chapelle, A., Nordman u. R. Gräs-
beck: Factors stimulating cell division
in cultured leucocytes.
9. Europ. Hämatol. Kongr. Lisabon 1963
S. 16

14. ~~Norman~~ Norman, C.T., T. Weber, A. de la Chapelle: The leuco-
cyte mitogenic action of leucoagglutinine.
X. Internat. Haemat. Kongress, Stock-
holm 1964 H : 29

15. Tien-wen Tao : Phytohemagglutinin elicitation of
specific anamnestic immune response
in vitro.
Science 146, 3641 : 247 (1964)

16. Punnet, Th. and H.H. Punnet: Induction of leucocyte
growth in cultures of human peripheral
blood.
Nature 198, 4886:1173 (1963)

17. Boll, I. und G. Fuchs: Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut 7 : 257 (1961)
18. Albrecht, M. und J. von Riesen: Einführung in die Zelldiagnostik des menschlichen Knochenmarkes und Blutes.
Walter de Gruyter, Berlin 1957.
19. Gerhartz in Müller - Seifert - von Kress: Taschenbuch der med.-klin. Diagnostik.
Bergmann, München (1962).
20. Boll, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkszellen in vitro;
Granuloblastenmitosen.
Folia haemat. 3, 1, 78 (1958)
21. Rohr, : Das menschliche Knochenmark
Thieme, Stuttgart (1960)
22. Nowell, P.C.: Stimulation of mitosis in rat marrow cultures by serum from infected rats.
Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine, 101, 347, (1959).
23. Hamann, S.: Proliferationsanregung der Granulopoese in vitro durch Östrogen.
Inauguraldissertation, Berlin (1964).
24. Astaldi, G.: Linfocito cellula staminale.
Risultati degli esperimenti con fitoemagglutina.
Estratto da Gazzetta Sanitaria XXXVI (1965,)
25. Astaldi, G., L. Ratto, R., Airo: Sur l'effet de la phytohemagglutinine dans un cas de leucémie a basocytes.
Schweiz. med. Wschr. 94, 38 : 1345 (1964)
26. Gropp, A., R. Fischer: Ergebnisse der Züchtung von Lymphocyten in vitro.
Klin. Wschr., 44, 12 : 665 (1966)

27. Papac, Rose, J.:

Effect of phytohaemagglutinin on marrow
regeneration in rodents.
Lancet 1966, I:63 - Ref. Kgr.Z.285,
4:450 (1966).

Frau Privatdozentin Dr.med. I. B o l l schulde ich
Dank für die Leitung der Arbeit und die Hilfe an den
entscheidenden Punkten.

Herrn Privatdozenten Dr. Dr. F u c h s möchte ich
Dank sagen für seine Beratung bei der Anlage der
Kurven und der Berechnung der Signifikanz.

Lebenslauf.

Am 5. Oktober 1941 wurde ich als Sohn des Verwaltungs-
amtmanns Rudi S a l c h o w und seiner Ehefrau
Herta S a l c h o w geb. M a r k u s in Berlin-Neukölln
geboren. Seit 1947 besuchte ich 6 Jahre lang die
11. Grundschule im Bezirk Neukölln und wechselte dann
auf die 1. O.W.Z.-Neukölln, die heutige Albrecht-Dürer-
Schule über. Im März 1960 legte ich dort die Reifeprüfung
ab und begann anschließend im Sommersemester 1960 mit dem
Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin.
Im April 1961 bestand ich dort das Vorphysikum und
im Oktober 1962 das Physikum. Meine klinischen Studien
setzte ich ununterbrochen an der Freien Universität
Berlin fort und beschloß sie im Oktober 1966 mit
dem Staatsexamen. Danach arbeitete ich einen Monat
als Medizinalassistent auf der Chirurgischen Abteilung
des Städtischen Humboldt-Krankenhauses in Berlin-
Reinickendorf. Seit Januar 1967 bin ich als Medizinal-
assistent auf der I. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Neukölln tätig.

